F 1330

66

studii şi cercetări de biochimie

1

TOMUL 23

1980

IANUARIE — IUNIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 23, nr. 1, p. 1 — 120, 1980, Bucureşti

SCBIAS—23 (1), (1980)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil :

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct :

H. SLUȘANSCHI

Membri :

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România ; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție :

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 de lei.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei. Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P. O. Box 136—137, telex : 11226, 70116 — București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie" : București, P. O. Box 1002, 78171 București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 71021

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 23, nr. 1 1980

IANUARIE – IUNIE

SUMAR

L. M. BURUIANĂ, M. ŞERBAN, M. PETCULESCU, Izoenzimele L(+) lactat-dehidrogenazei din diferite organe la cîteva specii de animale 3

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ, ANA IONIŢĂ, Rolul părţii glucidice în degradarea intracelulară a glicoproteinelor. X. Degradarea componentei secretoare cu catepsina umană în prezenţa unui amestec glicozidazic din *Streptomyces griseus* 13

VICTORIA DOBRE, C. DIMITRIU, FLORICA CHELU, Studii pe lipozomi. I. Includerea β-galactozidazei din *Phaseolus vulgaris* 21

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, RODICA RADU, V. FILIP, E. SEROPIAN, Dinamica apariţiei şi persistenţei imunoglobulinei A secretoare şi lactoferinei în saliva persoanelor cu infecţii repetate, vaccinate cu Bronhodin 27

MAGDALENA LUNGU, MONA VOCIU, ELENA SĂSĂRMAN, CONSTANŢA MUŞOLAN, CORINA IORDACHE, Activitatea β-aspartatkinazei şi a catalazei la *Corynebacterium melassecola* cultivat în condiţii nefavorabile de agitare şi mediu 37

EUGEN MACOVSCHI, Definiţiile vieţii 51

I. MOISA, I. VĂTAFU, A. FĂRKAŞ, Activitatea nitrogenazică în culturi pure de bacterii 55

G. NEAMŢU, GH. ILLYES, Cercetări chemotaxonomice la plante superioare. XIV. Pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din patru specii ale genului *Euphorbia* 63

ANCA ROŞEANU, S. VASU, Activitatea lactazică şi maltazică a unor tulpini de *Aspergillus* 69

HORST D. SCHELL, IRINA CORNOIU, MIHAI GÎRTAN, Proprietăţile amiloglucozidazei legate covalent de agaroza activată cu BrCN 75

GR. TURCU, MARIANA CONSTANTINESCU, Cercetări experimentale asupra fotooxidării bilirubinei *in vitro* 83

REFERAT GENERAL

CECILIA MOTAŞ, Funcţia părţii glucidice a imunoglobulinelor 87

RECENZII 103

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 23, n° 1 — 1980

JANUARY — JUNE

CONTENTS

L. M. BURUIANĂ, M. ŞERBAN, M. PETCULESCU, The L(+) lactate dehydrogenase izoenzymes pattern of different organs in some animals 3

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ, ANA IONIŢĂ, The role of carbohydrate moiety in the intracellular degradation of glycoproteins. X. Hydrolysis with cathepsin B_1 of SC treated with *Streptomyces griseus* glycosidases 13

VICTORIA DOBRE, C. DIMITRIU, FLORICA CHELU, Studies on liposomes. I. The entrapment of *Phaseolus vulgaris* β-galactosidase 21

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, RODICA RADU, V. FILIP, E. SEROPIAN, SIgA and lactoferrin synthesis in saliva of patients with respiratory diseases treated with Bronhodin 27

MAGDALENA LUNGU, MONA VOCIU, ELENA SĂSĂRMAN, CONSTANŢA MUŞOLAN, CORINA IORDACHE, β-aspartokinase and catalase activities in *Corynebacterium melassecola* cultured in unfavourable stirring conditions and culture medium 37

EUGEN MACOVSCHI, Definitions of life 51

I. MOISA, I. VĂTAFU, A. FĂRKAŞ, Nitrogenase activity in bacteria pure cultures 55

G. NEAMŢU, GH. ILLYES, Chemotaxonomical researches in higher plants XIV. Carotenoid and chlorophyll pigments from four species of genus *Euphorbia* 63

ANCA ROŞEANU, S. VASU, Lactase and maltase activity of several strains of *Aspergillus* 69

HORST D. SCHELL, IRINA CORNOIU, MIHAI GÎRTAN, Herstellung und eigenschaften der an BrCN-akitivierte agarose kovalent gebundenen amyloglukosidase 75

GR. TURCU, MARIANA CONSTANTINESCU, Experimental studies on the bilirubin photooxidation *in vitro* 83

GENERAL REVIEW

CECILIA MOTAŞ, The sugar moiety of immunoglobulins 87

REVIEWS 103

IZOENZIMELE L(+) LACTATDEHIDROGENAZEI DIN DIFERITE ORGANE LA CÎTEVA SPECII DE ANIMALE

L. M. BURUIANĂ, M. ŞERBAN, M. PETCULESCU

Rezumat. S-au determinat izoenzimele lactatdehidrogenazei din diferite organe la unele specii de animale şi s-au evidenţiat unele particularităţi şi corelaţii în funcţie de organ şi specie. Heterogenitatea izoenzimelor LDH scade în organele animalelor situate pe trepte inferioare de evoluţie cu tendinţa de uniformizare a activităţii enzimatice a acestora. În general, cea mai mare activitate se întîlneşte la izoenzimele LDH_5 din muşchii scheletici şi la izoenzima LDH_1 din inimă. La găină, izoenzimele cu viteza de migrare minimă sînt cele mai active atît în muşchiul scheletic cît şi în cel din inimă, iar la cobai izoenzimele cu viteză de migrare maximă sînt cele mai active în ambele tipuri de muşchi. Aceste diferenţe reflectă probabil tipul predominant al metabolismului energetic din organe la speciile cercetate.

Heterogenitatea L(+) lactatdehidrogenazei (LDH) a deschis un nou capitol în domeniul structurii moleculare a enzimelor, cu interesante implicaţii practice şi ştiinţifice. Prima observaţie asupra ei a fost făcută de A. Meister (1) şi confirmată rapid de J.B. Neilands (2). Th. Wieland şi G. Pfleiderer (3) reuşesc să separe electroforetic 5 sau mai multe fracţiuni cu activitate LDH din aproape toate organele.

Diferitele fracţiuni cu activitate LDH au fost numite de C.L. Markert şi F. Müller (4) izoenzime sau forme moleculare multiple enzimatice. În ultimii 20 de ani s-au întreprins numeroase cercetări cu privire la polimorfismul LDH, care manifestă anumite particularităţi în funcţie de organ şi care se modifică specific în anumite cazuri patologice. Polimorfismul LDH s-ar datora existenţei a două subunităţi parentale, denumite M şi H (5), (6), determinate de o genă cu 2 alele.

Asociaţia tetramerică în diferite proporţii a acestor subunităţi corespunde necesităţilor metabolice ale diferitelor organe.

Există însă dovezi experimentale (7), (8) care sprijină părerea că izoenzimele LDH sînt constituite din unirea unui singur monomer, dotat cu activitate enzimatică, cu anumite proteine inactive din ţesuturi, pentru a face faţă necesităţilor metabolice. Este deci interesant a se cunoaşte aspectul izoenzimatic al LDH din diferitele organe ale speciilor situate pe diferite trepte de evoluţie pentru înţelegerea determinismului metabolic. În plus, asemenea investigaţii permit detectarea modificărilor patologice ale organelor, precum şi testarea activităţii şi a toxicităţii unor substanţe introduse cu alimentele sau a unor medicamente.

MATERIAL ŞI METODE

Organele au fost prelevate de la animale sănătoase sacrificate la abator (bovine, ovine, porcine şi pui broiler) sau în laborator (iepuri, cobai, broască). După curăţirea de grăsime şi de ţesut conjunctiv, organele s-au spălat bine de sînge şi s-au omogenizat mecanic cu nisip de cuarţ, utilizînd ca extractant apa distilată în proporţie 1 : 10 (g/v). Extracţia cu apă distilată

este cea mai indicată în cazul LDH, deoarece în acest mod nu se modifică structura enzimatică, cum se întîmplă în cazul extracţiei cu soluţii saline, detergenţi etc.

Omogenatul s-a centrifugat 20 de minute cu viteza de 10 000 × g, iar supernatantul obţinut s-a păstrat la rece (4°C). Conţinutul în proteină s-a determinat prin metoda biuretului. Separarea izoenzimelor s-a efectuat prin electroforeză în gel vertical şi poliacrilamidă 7,5% la pH 8,3 (9). Proteinele s-au identificat prin colorare cu soluţia 0,2% de negru amido 10 B şi apoi decolorare prin spălare cu soluţie 7% acid acetic. Izoenzimele LDH s-au evidenţiat cu tehnica lui N.C. Karr şi C.M. Pearson (10). Incubarea cu soluţia substrat s-a făcut la 37°C timp de 1 oră. Proteinogramele şi enzimogramele au fost evaluate cantitativ prin densitometrie cu aparatul Zeiss EIR 60. Probele analizate electroforetic conţineau întotdeauna aceeaşi cantitate de proteină.

REZULTATE

În figurile care urmează este reprezentat aspectul densitometric al izoenzimelor LDH din extractele de organe la diferite specii. Ele sînt situate în regiunea corespunzătoare fracţiunilor globulinice ale serului; nu se constată o proporţionalitate între valorile cantitative ale acestor fracţiuni şi activitatea enzimatică.

În general, intensitatea de colorație a izoenzimelor LDH este mult mai mare decît cea a fracţiunii proteice corespunzătoare. Uneori, prezenţa unei izoenzime LDH nu corespunde vreunei fracţiuni proteice. În acest caz, activitatea enzimatică este un indicator mai sensibil pentru detectarea

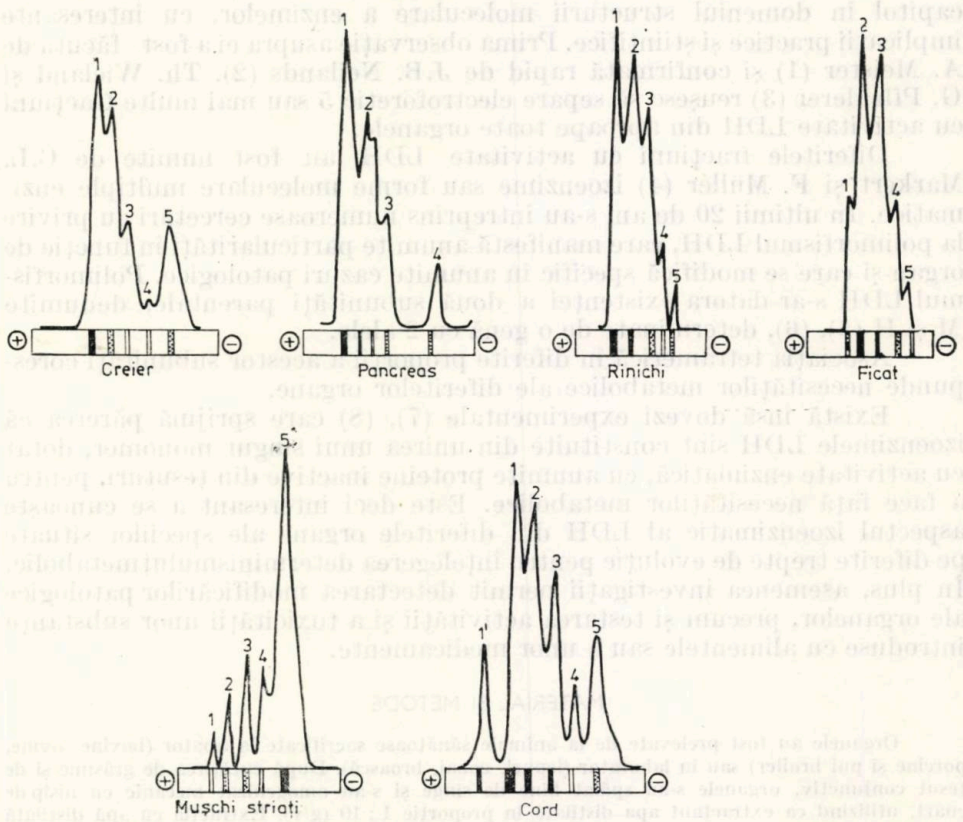


Fig.1. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de bovine. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson (10).

unei fracţiuni proteice minore decît negrul amido. Numărătoarea izoenzimelor LDH s-a făcut conform convenţiei IUB, cea mai rapidă fracţiune către anod fiind desemnată cu numărul 1 (ex. LDH_1).

Organele de bovine (tăuraşi de 6 luni, puşi la îngrăşat). Distribuţia izoenzimelor LDH în diferite organe este arătată în figura 1.

Polimorfismul LDH este foarte asemănător în toate organele, cu excepţia muşchilor scheletici, în care izoenzima LDH_5 este cea mai activă. În celelalte organe predomină cantitativ izoenzima LDH_1, fapt ce denotă profilul metabolic aerob al acestor organe în comparaţie cu muşchiul scheletic.

Organele de ovine. Semnalăm că aspectul modelului izoenzimatic în cazul pulmonului, pancreasului şi rinichiului este diferit de cel menţionat de E.S. Vessel (11). Astfel, fracţiunea corespunzătoare ca mobilitate electroforetică izoenzimei LDH_5 nu se evidenţiază în aceste organe, spre deosebire de ficat, muşchiul scheletic şi cord (fig. 2). Se remarcă şi în acest caz

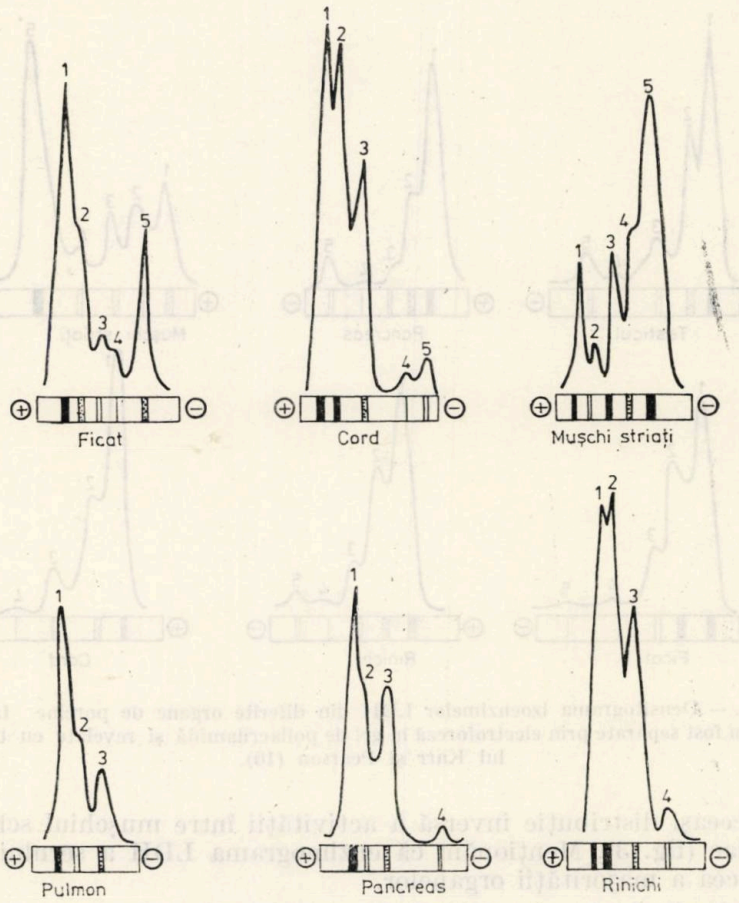


Fig. 2. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de ovine. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson (10).

distribuţia inversă a activităţii în cazul muşchiului scheletic în raport cu celelalte organe, inclusiv cordul.

Organele de porcine. La porcine, cea mai activă izoenzimă în toate organele, cu excepţia muşchiului scheletic, este LDH_1. Şi în acest caz

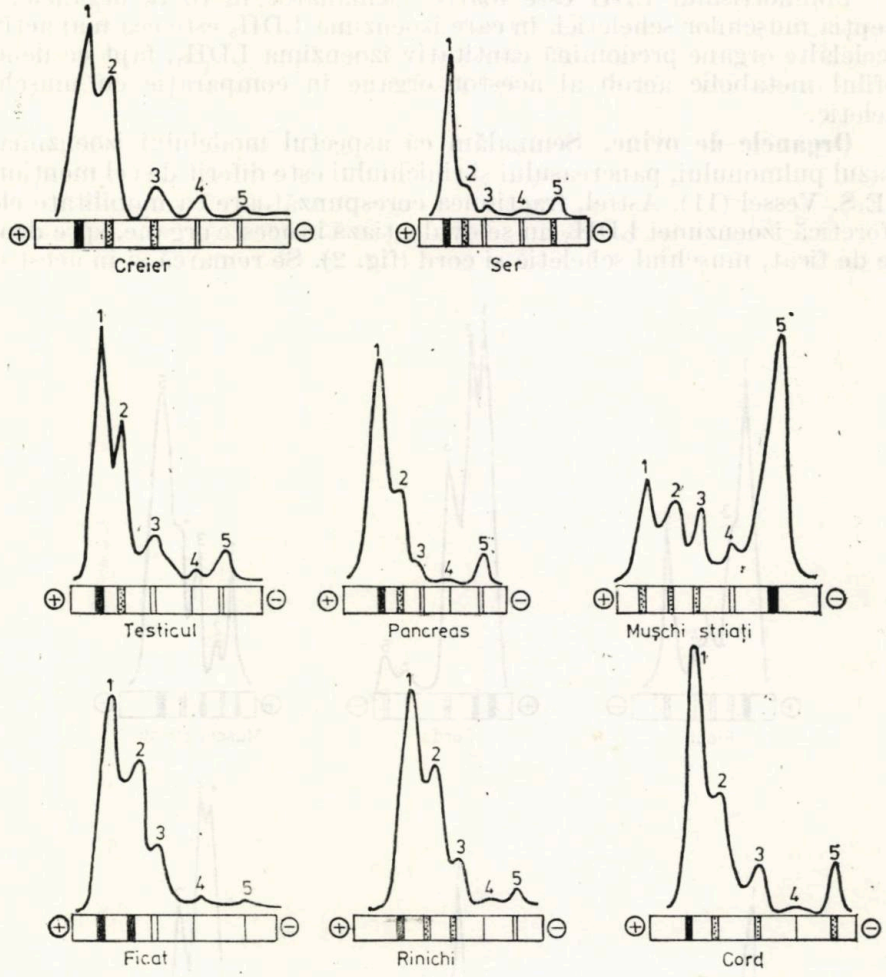


Fig. 3. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de porcine. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson (10).

există aceeaşi distribuţie inversă a activităţii între muşchiul scheletic şi cel cardiac (fig. 3). Menţionăm că enzimograma LDH a serului reflectă fidel pe cea a majorităţii organelor.

Organele de iepure. Distribuţia izoenzimelor din organele acestei specii este reprezentată în figura 4. Se constată că distribuţia cantitativă a activităţii izoenzimelor este mai uniformă decît la speciile precedente,

fracţiunea LDH_1 fiind cea mai activă, în afară de muşchiul scheletic, unde se constată aceeaşi distribuţie inversă a activităţii. Se remarcă de asemenea că, în cazul creierului şi al splinei, fracţiunea corespunzătoare ca mobilitate izoenzimei LDH_5 nu se evidenţiază.

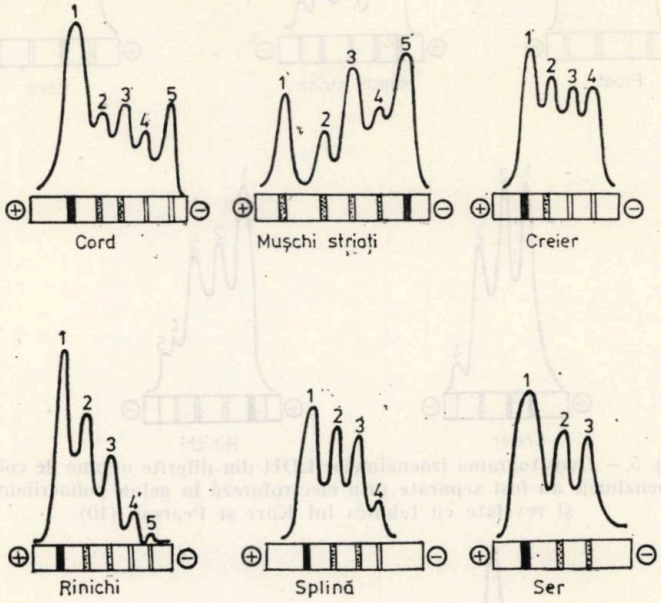


Fig. 4. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de iepure. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson(10).

Organele de cobai. Activitatea izoenzimelor este şi în acest caz mai uniformă decît la speciile precedente, după cum se constată din figura 5. În cazul tuturor organelor, fracţiunea LDH_1 este cea mai activă, inclusiv în muşchiul scheletic. Izoenzima LDH_2 este foarte activă în inimă şi în creier. De altfel, în aproape toate organele fracţiunea LDH_2 este la fel de activă ca şi LDH_1, particularitate întîlnită numai la această specie. În unele organe (ficat, creier, inimă), LDH_5 nu a putut fi pusă în evidenţă.

Organele de găină. La găină, numărul izoenzimelor scade în funcţie de organ la numai 4 fracţiuni sau chiar la 3. Cele mai active sînt fracţiunile lente, cu excepţia cordului, unde şi fracţiunea LDH_1 (rapidă) este destul de activă, după cum reiese din densitogramele din figura 6. În ceea ce priveşte serul sanguin, de cele mai multe ori nu se întîlneşte decît o singură izoenzimă corespunzătoare fracţiunii lente LDH_5, probabil de origine hepatică.

Organele de broască. La broască, numărul izoenzimelor este şi mai mic, numai 2—3, remarcîndu-se o simplificare a polimorfismului LDH.

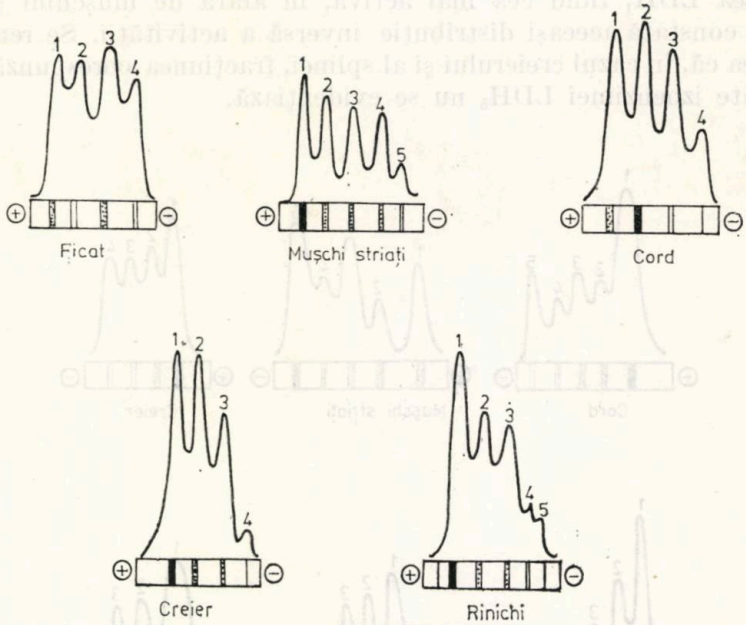


Fig. 5.— Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de cobai. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson (10).

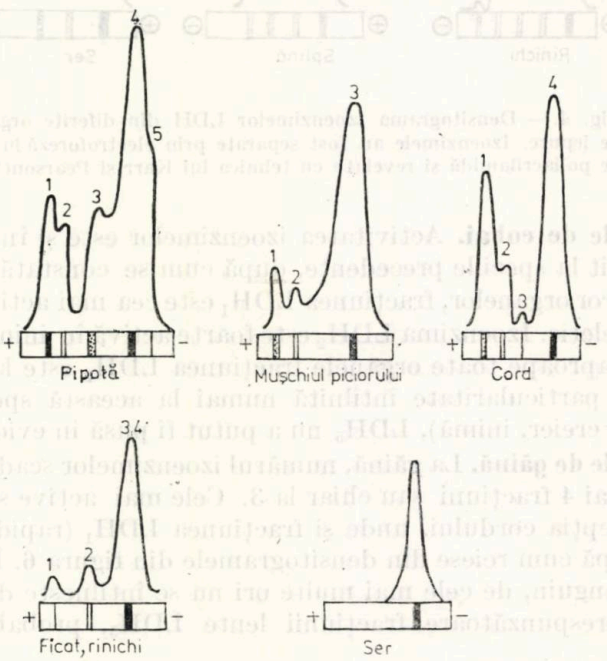


Fig. 6. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de găină. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă şi revelate cu tehnica lui Karr şi Pearson (10).

Se remarcă faptul că în cordul de broască, a cărui activitate este mare, aspectul enzimogramei LDH este asemănător cu cel al mamiferelor, izoenzima LDH_1 fiind cea mai activă.

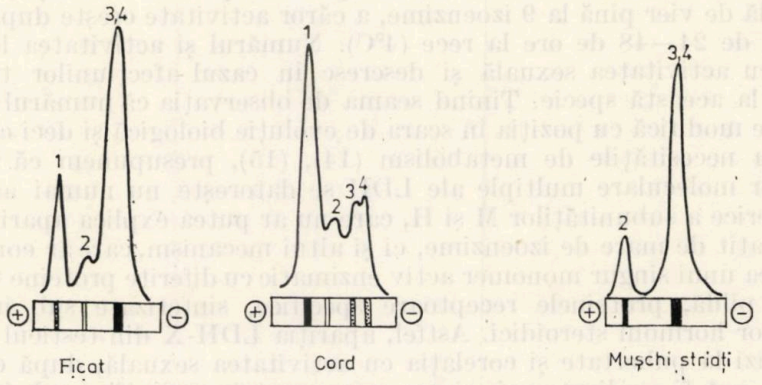


Fig. 7. — Densitograma izoenzimelor LDH din diferite organe de broască. Izoenzimele au fost separate prin electroforeză în gel de poliacrilamidă și revelate cu tehnica lui Karr și Pearson (10).

DISCUȚII

Mulți autori au încercat să atribuie, în cazul diferitelor organe de om, o distribuție specifică a izoenzimelor LDH. Astfel, E.S. Vessel (11) menționează că izoenzimele cu cea mai mare activitate sînt LDH_1 din inimă, LDH_1 și LDH_3 din pancreas și pulmon, LDH_1 și LDH_2 din rinichi și LDH_5 din mușchiul scheletic și ficat. Leucocitele și serul de om au cea mai mare activitate în cazul fracțiunilor LDH_1 și LDH_2. În general, aspectul enzimogramei LDH din ser reflectă rezultanta contribuției diferitelor organe și se modifică în anumite cazuri patologice în funcție de leziunea de organ, caz în care se înregistrează o „scurgere" a enzimelor din organul afectat. De pildă, în pancreatită se observă o creștere puternică a activității LDH_3, de obicei scăzută, iar în infarct o creștere rapidă și masivă a LDH_1. Datele noastre arată o altă distribuție a izoenzimelor LDH la animale, ca în cazul pulmonului, rinichiului și pancreasului. Se arată de asemenea că, în cazul creierului, cele mai active fracțiuni sînt LDH_1 și LDH_2, asemănător ca în cord, ceea ce pledează pentru un tip analog de metabolism al glucidelor, preponderent aerob. K. Zänker (12) găsește că la maimuță și la om izoenzimele LDH_1, LDH_2 și LDH_3 sînt cele mai active în raport cu LDH_4 și LDH_5. În cancerul creierului la aceste specii, izoenzimele LDH_4 și LDH_5 cresc puternic.

Numărul izoenzimelor a făcut de asemenea subiectul a numeroase cercetări, ca și comportarea lor imunologică, cea față de acțiunea efectorilor enzimatici, precum și a capacității analogilor coenzimatici nucleotidici de a participa la transferul hidrogenului etc.

Vom discuta numai despre structura moleculară a izoenzimelor LDH, pe care o sugerează rezultatele noastre. J.M. Allen (13) găsește la șoarece pînă la 9 izoenzime, iar L.M. Buruiană și A. Dema (7) separă din sperma-

tozoizii şi din plasma seminală de cocoş pînă la 10 izoenzime, din care cel puţin 3 în regiunea LDH_4—LDH_5, aşa-numita regiune a izoenzimelor LDH-X. Numărul lor variază cu activitatea sexuală, scăzînd puternic în faza repausului sexual. Recent (8) s-au găsit în spermatozoizii şi în plasma seminală de vier pînă la 9 izoenzime, a căror activitate creşte după o conservare de 24—48 de ore la rece (4°C). Numărul şi activitatea lor cresc odată cu activitatea sexuală şi descresc în cazul afecţiunilor tractului genital la această specie. Ţinînd seama de observaţia că numărul izoenzimelor se modifică cu poziţia în scara de evoluţie biologică şi deci cu adaptarea la necesităţile de metabolism (14), (15), presupunem că apariţia formelor moleculare multiple ale LDH se datoreşte nu numai asociaţiei tetramerice a subunităţilor M şi H, care nu ar putea explica apariţia unui număr atît de mare de izoenzime, ci şi altui mecanism, care ar consta din asocierea unui singur monomer activ enzimatic cu diferite proteine tisulare, ca, de pildă, proteinele receptoare specifice, sintetizate sub impactul diferiţilor hormoni steroidici. Astfel, apariţia LDH-X din testicul şi spermatozoizi la pubertate şi corelaţia cu activitatea sexuală, după cum am stabilit, pot fi explicate prin sinteza unor proteine specifice sub impactul androgenilor.

Existenţa unui singur monomer activ a fost pusă în evidenţă şi de A.W. Martin şi colab. (16) în cazul D (+) lactatdehidrogenazei. Inactivarea sau activarea izoenzimelor LDH de către uree sau de către proteazele tisulare, reacţii des întîlnite în cazul izoenzimelor LDH, se pot explica prin desfacerea asociaţiei dintre monomerul activ şi diferitele polipeptide inactive, formate pentru a satisface necesităţile metabolice ale ţesuturilor.

CONCLUZII

1. S-a determinat enzimograma izoenzimelor L(+) lactatdehidrogenazei din organele unor specii de animale, evidenţiindu-se unele particularităţi şi corelaţii în funcţie de organ şi specie.

2. Heterogenitatea şi distribuţia cantitativă a izoenzimelor LDH se modifică în raport cu poziţia speciei în scara evolutivă.

3. Cel mai mic număr de izoenzime şi o distribuţie cantitativă a acestora au fost puse în evidenţă în cazul unor organe la găină şi la broască.

4. În general, cea mai mare activitate o prezintă izoenzima LDH_5 din muşchii scheletici şi izoenzima LDH_1 din cord. Fac excepţie găina, unde cea mai activă izoenzimă este cea cu viteza minimă (LDH_4) atît în muşchii scheletici cît şi în cord, şi cobaiul, la care cea mai activă este izoenzima LDH_1 în ambele tipuri de muşchi.

5. Se emite o nouă ipoteză asupra mecanismului de formare a izoenzimelor LDH, bazată pe o serie de constatări experimentale.

Prezentat la redacţie
la 30 octombrie 1978

Facultatea de medicină veterinară,
Laboratorul de biochimie
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 105

THE L(+) LACTATE DEHYDROGENASE ISOENZYMES PATTERN OF DIFFERENT ORGANS IN SOME ANIMALS

SUMMARY

The pattern of LDH isoenzymes in different organs of animals is determined. The peculiarities of distribution, metabolic significance and activity of isoenzymes in the species studied are underlined. One remarks that the number of isoenzymes decreases from 5—6 to only 2—3 in the organs of animals situated in the lower part of the evolution scale, with the tendency of uniformization of the isoenzyme activity.

Usually the activity is different between the skeletal muscle (LDH_5 the most active) and the heart muscle (LDH_1 the most active).

A difference exists however between the hen, where the most active is the isoenzyme with the slowest rate of migration toward the anode, and the guinea-pig where the most active is the isoenzyme with the higher rate of migration both in skeletal and heart muscle. These differences reflect probably the type of energetic metabolism in the organs of the species studied. The structure of LDH isoenzymes is discussed and a new hypothesis is proposed.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Meister, J. biol. Chem., **184**, 117 (1950).
2. J. B. Neilands, J. biol. Chem., **199**, 373 (1952).
3. Th. Wieland, G. Pfleiderer, Biochem. Z., **329**, 112 (1957).
4. C. L. Markert, F. Müller, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **45**, 753 (1959).
5. N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, M. Hamolski, R. E. Bieber, Science, **131**, 392 (1960).
6. C. L. Markert, Science, **140**, 1329 (1963).
7. L. M. Buruiană, A. Dema, Rev. roum. Biochim., **15**, *1*, 9 (1979).
8. L. M. Buruiană, M. Petculescu, P. Dobrescu, Com. Simp. *Reproducere și patologia reproducerii în creșterea intensivă a animalelor*, 8—9. XII. 1978.
9. B. J. Davies, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
10. N. C. Karr, C. M. Pearson, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **50**, 995 (1963).
11. E. S. Vessel, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, *3*, 877 (1961).
12. K. Zänker, Inaug. Diss., L. Maximillians Univ. München, 1973.
13. J. M. Allen, Ann. N. Y. Acad. Sci., **94**, *3*, 937 (1961).
14. M. Șerban, Rev. roum. Biochim., *4*, 211 (1967).
15. M. Șerban, D. Cotariu, Rev. roum. Biochim., *4*, 325 (1968).
16. A. W. Martin, R. Jones, T. Mann, Proc. roy. Soc. London, B, **193**, 235 (1976).

ROLUL PĂRŢII GLUCIDICE ÎN DEGRADAREA INTRACELULARĂ A GLICOPROTEINELOR. X. DEGRADAREA COMPONENTEI SECRETOARE CU CATEPSINA UMANĂ ÎN PREZENŢA UNUI AMESTEC GLICOZIDAZIC DIN *STREPTOMYCES GRISEUS*

LUCIA BUZILĂ, CECILIA MOTAŞ, ANA IONIŢĂ*

Rezumat. Componenta secretoare izolată din colostrul uman a fost tratată cu endoglicozidaza din *Streptomyces griseus*, după care a fost supusă tratamentului cu catepsina B_1 izolată din ficatul uman. Modificările obţinute au fost urmărite în raport cu martorul (componenta secretoare netratată) prin imunoelectroforeză, dublă difuzie, electroforeză în disc în mediu alcalin şi imunoelectroforeză încrucişată. S-a ajuns la concluzia că o parte din lanţul glucidic al SC a fost scindat de către enzima de mai sus. Componenta secretoare deglucidizată în acest mod este mai susceptibilă la hidroliza cu catepsine, punînd în evidenţă un fragment anodic cu greutate moleculară mică.

Componenta secretoare (SC) este o glicoproteină de aproximativ 70 000 greutate moleculară, sintetizată în celulele epiteliale ale mucoasei externe (1). Această proteină a fost descoperită ca o subunitate a SIgA, imunoglobulina majoră în secreţiile externe. Studii mai recente (2) sugerează că SC este asociată în secreţiile externe atît cu IgA, cît şi cu IgM. În secreţii, SC se găseşte însă şi sub formă liberă (3).

În scopul elucidării rolului SC s-au făcut foarte multe studii. Ideea de a conferi imunoglobulinelor A o rezistenţă crescută la degradarea proteolitică este susţinută de o serie de argumente (4), (5), (6), proprietatea fiind avantajoasă pentru SIgA în mediul bogat în proteaze al unor secreţii externe. S-a mai propus rolul de mediere a transportului IgA şi IgM prin epiteliul mucoaselor (1), (7), ca receptor al membranei epiteliale pentru imunoglobulinele secretorii (1) sau ca receptor al limfocitelor purtătoare de IgA, mediind trimiterea selectivă a celulelor purtătoare de IgA pe mucoasele externe (8). Totuşi, transportul imunoglobulinelor secretorii nu este controlat simplu de receptori, ci poate implica participarea lanţului J, atracţia imunocitelor care sintetizează imunoglobuline secretoare, ca şi stimularea locală a eliberării imunoglobulinelor de pe asemenea celule (9).

SC este o glicoproteină formată dintr-un singur lanţ polipeptidic; greutatea ei moleculară nu este alterată de reducere şi alkilare nici în condiţii severe, în acest caz obţinîndu-se o distribuţie cromatografică polidispersă (10).

Rezultatele obţinute referitor la compoziţia în aminoacizi a SC sînt foarte diferite (11), (12), (13), (14), dar unele din ele sînt asemănătoare (15), (16), (17), indicînd o cantitate foarte redusă de metionină şi cantităţi mari de cisteină.

Cantitatea de glucide din SC variază în limite extrem de mari: 19,4% (13) şi 9,5 % (11), cu valori intermediare de 18,6% (18), 15% (16), 11,6% (15) sau 11,5% (12).

Procentajul greutăţii fiecărei componente monozaharidice este dat de Sletten şi colab. (18) (tabela 1).

Nici unul dintre autorii menţionaţi nu a definit secvenţa glucidelor în unităţile oligozaharidice asociate cu SC, dacă sînt predominant complexe, de tip A, sau simple, de tip B. Raporturile dintre ele, aşa cum reiese din tabela 1, ar indica prezenţa ambelor tipuri de lanţuri glucidice.

Tabela 1

Compoziţia în glucide a componentei secretoare libere (18)

Compoziţia	Greutatea (%)
Fucoză	2,1
Manoză	3,6
Galactoză	4,1
N-acetilglucozamină	4,8
N-acetilgalactozamină	urme
Acid N-acetilneuraminic	4,0

În scopul elucidării acestei probleme, ne-am propus o cale ocolită, aceea de a întrebuinţa enzime glicozidazice, de tipul endo-N-acetilglucozaminidază, D şi H (19), (20), fiecare scindînd selectiv lanţurile oligozaharidice complexe (A) şi, respectiv, simple (B).

Pînă la ora actuală nu se cunoaşte nimic în privinţa rolului părţii glucidice atît de mari din molecula SC. Deoarece fiecare receptor Fc sau proteină care prinde imunoglobulina (ca SC) caracterizate pînă în prezent sînt glicoproteine, şi rolul părţii glucidice în funcţionarea receptorilor a devenit din ce în ce mai important (21). Implicarea părţii glucidice din imunoglobuline sau din SC în interacţiunile receptorului Fc şi în activităţile efectoare ale imunoglobulinelor este încă neelucidată.

Întrebuinţarea endo-N-acetilglucozaminidazei H din *Streptomyces griseus* pentru obţinerea unui preparat de SC sărăcit în partea glucidică poate aduce contribuţii şi asupra rolului SC la nivelul mucoaselor.

Avînd în vedere cele arătate, în lucrarea de faţă am încercat îndepărtarea parţială a glucidelor din molecula SC cu ajutorul unui amestec glicozidazic din *Streptomyces griseus*, bogat în endo-N-acetilglucozaminidază H. Ulterior am comparat comportarea la proteoliză cu catepsină B_1 a preparatului modificat faţă de cel nativ.

MATERIAL ŞI METODE

Obţinerea componentei secretoare s-a făcut din colostru uman decazeinificat după metoda lui Newcomb (22), modificată de Mestecky (23).

Separarea şi purificarea parţială a glicozidazei din Streptomyces griseus. În vederea obţinerii unui amestec glicozidazic am utilizat o tulpină de *Streptomyces griseus* obţinută de la ICCF. S-a lucrat după indicaţia lui Tarentino (20), utilizîndu-se mediul cu chitină Jeaunniaux. S-au practicat primele trei trepte de purificare ale enzimei relatate de către acelaşi autor, adică precipitarea cu acetat de zinc a filtratului, urmată de două precipitări cu sulfat de amoniu (40 şi 90%) ale supernatantului obţinut după precipitarea cu sulfat de zinc. Ultimul precipitat, care conţine enzima, a fost dizolvat într-un volum minim de fosfat de potasiu 0,01 M, pH 8,45 şi dializat faţă de 6 l din acelaşi tampon timp de 3 zile. Acest preparat enzimatic s-a utilizat în lucrarea de faţă.

Testarea activităţii s-a făcut pe DN-ază (20). S-a cercetat şi activitatea pronazică a preparatului glicozidazic folosind metoda de determinare semnificativă a activităţii enzimatice

prin difuzia radială în geluri (24), (25). Înainte de utilizare pentru deglucidizare, preparatul enzimatic a fost dializat timp de 2 zile pe tamponul de incubare citrat-fosfat 0,1 M, pH 5,6.

Separarea și purificarea parțială a amestecului de catepsine B din extractul de ficat uman s-au făcut după metoda lui Barrett (26), (27). Preparatul obținut de noi a conținut 5,9 mg proteină și 55 u.i. la 1 ml. Activitatea specifică a fost 9,3.

Acțiunea glicozidazelor asupra componentei secretoare s-a efectuat în tampon citrat-fosfat 0,1 M, pH 5,6 timp de 96 de ore la 37°C. Raportul enzimă glicozidazică /SC a fost de 1/5.

Acțiunea catepsinelor B_1 asupra componentei secretoare deglucidizate. Incubarea s-a făcut după Meninger (28).

Peste componenta secretoare deglucidizată s-au adăugat în mediul de incubare atît EDTA, cît și ditiotreitol pentru a avea o concentrație de 0,001 M. Raportul dintre catepsină și SC a fost de 3/100. Amestecul s-a ținut la incubare timp de 72 de ore la 37°C.

Imunoelectroforeza s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal pH 8,6, $\mu = 0{,}05$, după Scheidegger (29). S-a utilizat ser de iepure anticomponentă secretoare.

Dubla difuzie s-a efectuat în gel de agaroză după metoda lui Ouchterlony (30).

Disc-electroforeza în poliacrilamidă (PAA) în mediul alcalin s-a făcut după metoda Davis (31).

Imunoelectroforeza încrucișată s-a efectuat, după Ganrot (32), în gel de agaroză 1%, folosindu-se același tampon ca la imunoelectroforeză. Timpul de migrare a fost de 3 ore atît într-un sens cît și în celălalt, utilizîndu-se 200 V și 1 mA/cm. Concentrația antiserului înglobat în agaroză a fost de 1/20.

Prepararea serurilor imune anticomponentă secretoare s-a făcut pe iepuri. Administrarea antigenului a avut loc în două reprize a cîte 10 injecții intradermice. La o repriză s-au injectat 2 mg componentă secretoare în 0,5 ml ser fiziologic cu 0,5 ml adjuvant Freund complet Calbiochem. Intervalul dintre cele două reprize a fost de 2 săptămîni. La 10 zile după ultima injecție, animalele s-au sîngerat din ureche pentru proba existenței anticorpilor și apoi s-au sîngerat total pentru recoltarea serului.

REZULTATE

S-a lucrat pe următoarele probe:

I. SC + glicozidază
II. SC + glicozidază + catepsină
III. SC + catepsină
IV. SC

Activitatea proteazică a amestecului glicozidazic din *Streptomyces griseus.* Amestecul glicozidazic s-a obținut după indicațiile lui Tarentino (20) pînă la etapa a patra, adică la cromatografia pe DEAE-celuloză. Primele rezultate obținute prin întrebuințarea preparatului glicozidazic ca agent de scindare a oligozaharidelor de tip simplu (33) din structura componentei secretoare au sugerat prezența unor proteaze în preparat. Deoarece din *Streptomyces griseus* se obțin pronaze, din care în ultimul timp se separă alte tipuri de proteaze (34), (35), am urmărit prezența proteazelor în preparatul nostru. Folosind enzima ca substrat, în condițiile noastre de lucru cu amestecul glicozidazic prin metoda difuziei radiale (24) am obținut o hidroliză echivalentă cu cea dată de 100 μg/ml de pronază din preparat comercial Serva.

Imunoelectroforeza este redată în figura 1.

Se constată că proba tratată cu glicozidază (I) conține, pe lîngă SC, și material cu proprietăți antigenice și electroforetice deosebite, care este pus în evidență de apariția celei de-a doua linii de precipitare la capătul anodic al liniei de precipitare date de SC intactă.

Dacă comparăm viteza de migrare a liniei de precipitare principale a probei I cu cea a SC intacte (IV), se constată că sînt deosebite, ambele linii ale probei tratate (I) fiind deplasate spre anod față de SC intactă.

Tratarea SC cu catepsină (III) conduce la apariţia unui material antigenic deosebit de SC intactă, care se evidenţiază prin apariţia unei a doua linii de precipitare, dar la capătul catodic al liniei de precipitare date de SC intactă.

În acest caz, linia de precipitare principală nu este deplasată faţă de linia SC intactă (IV).

Din aceste rezultate reiese că preparatul cateptic este slab activ, scindînd fie o porţiune din SC care nu modifică comportarea electroforetică a SC rămase, fie o populaţie deosebită de SC, majoritatea rămînînd intactă.

În schimb, preparatul glicozidazic conţine o protează activă, care scindează puternic SC în fragmente cu deplasare anodică mai mare, nerămînînd, se pare, SC intactă. Această comportare este asemănătoare acţiunii tripsinei sau subtilizinei asupra SC, menţionată de Kobayashi şi colab. (36).

În aceste condiţii, nu mai putem şti dacă endo-N-acetilglucozaminidaza din preparatul de *Streptomyces griseus* a acţionat înaintea pronazelor, concomitent cu ele sau ulterior lor, în acest caz la nivelul oligozaharidelor din fragmentele de SC.

Acţiunea catepsinelor asupra SC tratate anterior cu amestecul din *Streptomyces griseus* (II) prezintă o imagine asemănătoare acţiunii cumulate a celor două enzime, acţionînd asupra SC intacte, adică deplasare anodică, două linii anodice şi două linii catodice.

Reiese că, prin acţiunea amestecului din *Streptomyces griseus*, SC a rămas intactă, asupra ei acţionînd ulterior catepsina.

Dubla difuzie (fig. 2) confirmă apariţia fragmentelor de SC după acţiunea preparatului din *Streptomyces griseus* (I, II) şi după acţiunea catepsinelor (III, II). Din imaginea obţinută nu reies deosebiri între modul de acţiune a celor două tipuri de proteaze, dubla difuzie neaducînd nici un element nou faţă de imunoelectroforeză. Linia de precipitare dată de fragment este asemănătoare celei obţinute de Kobayashi prin acţiunea pepsinei şi evidenţiate tot prin dubla difuzie (36).

Disc-electroforeza (fig. 3) completează rezultatele date de imunoelectroforeză şi de dubla difuzie.

SC intactă prezintă migrarea din figura 3, IV. Se observă, pe lîngă banda groasă dată de SC, şi o parte din material rămas foarte aproape de start, care poate reprezenta agregatele de SC semnalate de Brandtzaeg (17).

În cazul preparatului nostru nu se observă fragmentul semnalat de Brandtzaeg în preparatele sale de SC (17). Acţiunea catepsinei asupra SC (III) conduce la micşorarea notabilă a agregatului catodic şi la apariţia unui fragment în cantitate mică, cu viteză mai mare de migrare. Totodată, se constată menţinerea SC intacte. Acţiunea amestecului glicozidazic-proteazic (I) duce de asemenea la reducerea agregatelor, la menţinerea de SC intactă (în cantitate mai mică decît în cazul acţiunii catepsinei) şi la apariţia fragmentului cu viteză de migrare asemănătoare celui obţinut prin acţiunea catepsinei. Aceste fragmente dau linia de precipitare cu viteză mai mare decît la dubla difuzie, linie care prezintă identitate totală.

Sub acţiunea catepsinei, ulterior celei a glicozidazelor (II), se constată dispariţia totală a agregatelor, menţinerea unei cantităţi reduse de SC intactă şi a fragmentului obţinut prin acţiunea lor, dar şi apariţia

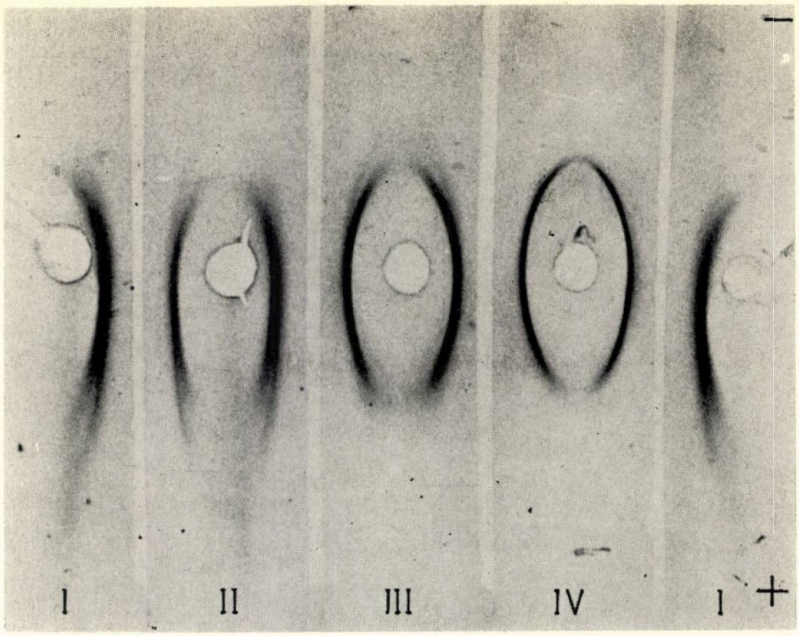


Fig. 1. — Imunoelectroforeza în gel de agaroză a probelor:
I. componenta secretoare + glicozidaza din *Streptomyces griseus*
II. componenta secretoare + glicozidază + catepsină
III. componenta secretoare + catepsină
IV. componenta secretoare (martor)

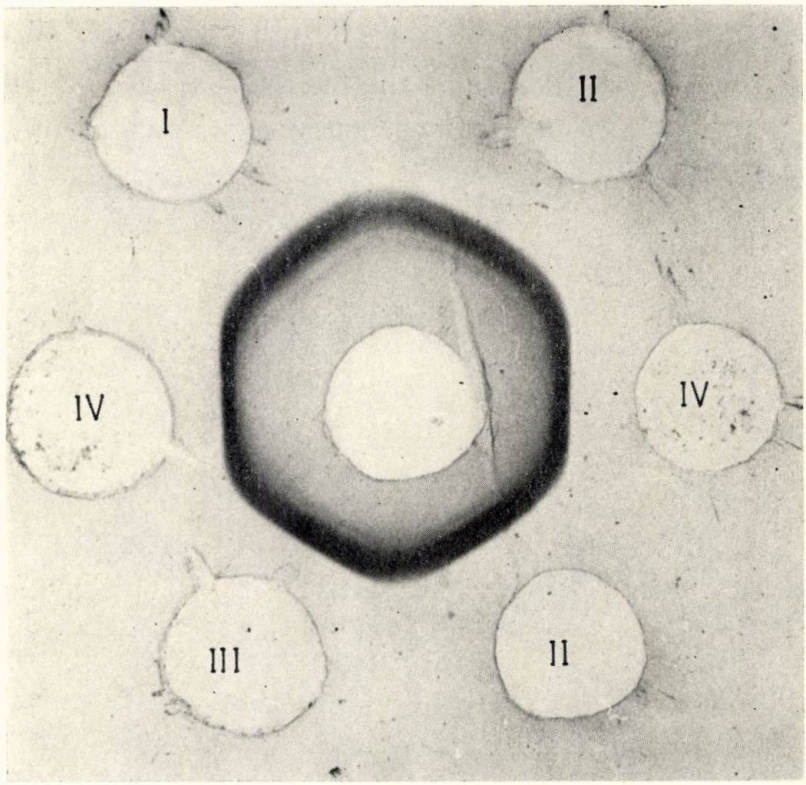


Fig. 2. — Dubla difuzie în gel de agaroză a probelor. Numerotarea probelor este aceeaşi ca în figura 1. În godeul din mijloc s-a pus ser de iepure anticomponentă secretoare.

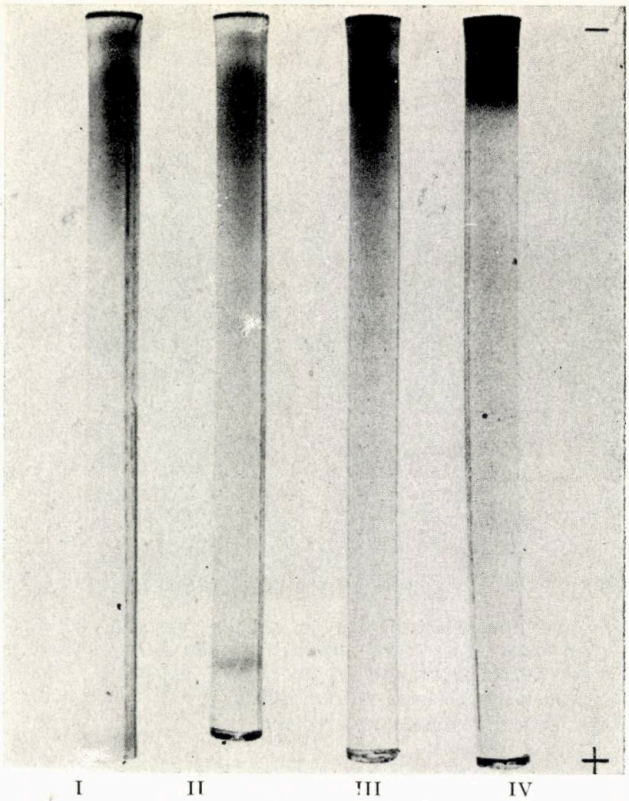


Fig. 3. — Electroforeza în disc în gel de poliacrilamidă a probelor. Numerotarea probelor este aceeași ca în figura 1.

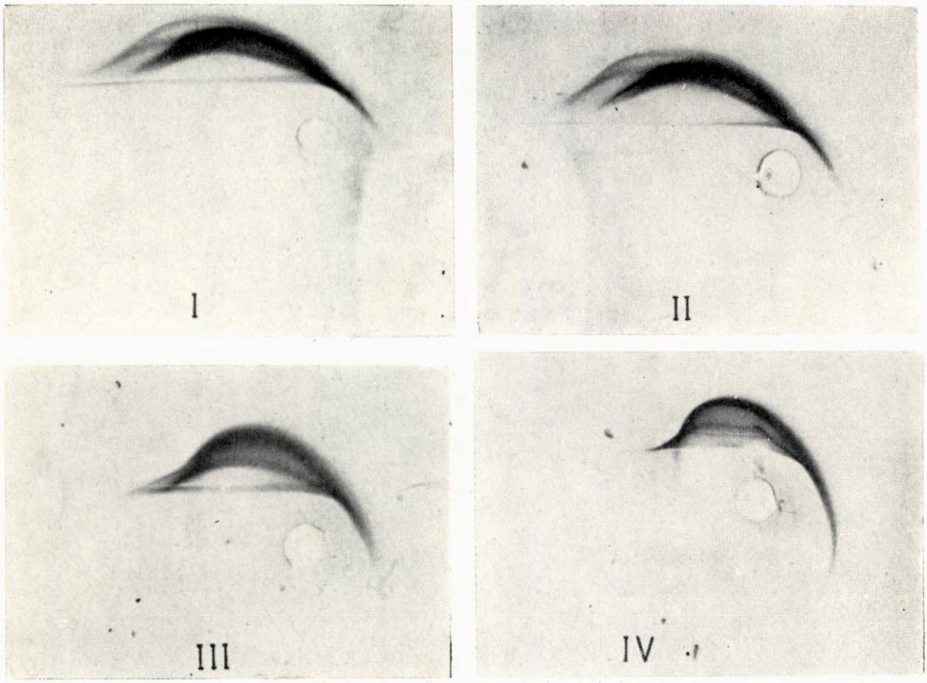


Fig. 4. — Crossimunoelectroforeza probelor. S-a utilizat ser anticomponentă secretoare. Numerotarea probelor este aceeași ca în figura 1.

unui fragment cu greutate moleculară mică, vizibil la capătul anodic. Cum cantitatea de SC și de fragment a rămas practic aceeași (vezi intensitatea benzilor I și II), reiese că fragmentul foarte anodic provine din agregatul dispărut.

Se poate presupune că glicozidaza din *Streptomyces griseus* a acționat la nivelul oligozaharidelor din acest agregat, conducînd la o acțiune specifică a catepsinei la acest nivel, cu eliberarea fragmentului anodic. Dacă glicozidazele nu ar fi acționat asupra SC odată cu proteazele, sub acțiunea ulterioară a catepsinei ar fi trebuit să se scindeze agregatul asemănător intervenției ei singulare (III), dînd SC și fragment, fără cel de-al doilea fragment foarte anodic.

Acesta este argumentul că endo-N-acetilglucozaminidaza a acționat asupra preparatului de SC și a modificat structura glucidică a componentelor de SC din amestec, conducînd la o hidroliză mai avansată de către catepsină.

Electroforeza încrucișată (fig. 4) confirmă prezența agregatelor cu o viteză de migrare mult mai mică în preparatul nostru de SC (IV) și în cel tratat cu catepsină (III). Nu se obțin rezultate concludente pentru punerea în evidență a proteolizei cu catepsină după tratare cu amestec din *Streptomyces griseus* (II și III).

DISCUȚII

În dorința de a elucida unele implicații ale prezenței lanțurilor oligozaharidice în molecula SC, anterior am încercat să scindăm această fracțiune a moleculei cu mai multe enzime glicozidazice, cum sînt neuraminidaza (37) sau endo-N-acetilglucozaminidaza *Diplococcus pneumoniae* (38). În acele lucrări am arătat că îndepărtarea acidului sialic conduce la o proteoliză mai avansată a moleculei de SC, pe cînd în cazul întrebuințării extractului glicozidazic din *D. pneumoniae* se constată, din contră, o creștere a rezistenței la proteoliză a SC modificate la lanțul glucidic (27).

În prezenta lucrare, din cauza necunoașterii secvenței glucidelor în lanțurile oligozaharidice, am tatonat posibilitatea întrebuințării unui extract al mediului de cultură de la *Streptomyces griseus* (20) ca agent de scindare a părții glucidice, știut fiind că în acest extract se găsește o enzimă ce poate scinda legătura dintre două β-N-acetilglucozamine din structura unui oligozaharid de tip simplu (20), (39). Numai că preparatul nostru a conținut, pe lîngă enzima endoglicozidazică, și o proteină, care ne-a complicat protocolul de lucru, deoarece noi urmăream scindarea SC cu enzime proteolitice ulterior acțiunii glicozidazice.

Din rezultatele acestei lucrări ar reieși că o parte din lanțul glucidic a putut fi scindată de către endo-N-acetilglucozaminidaza H, prezentă în preparatul nostru, și că deci în lanțul glucidic al SC se găsesc structuri simple, neobișnuite, de tip „high mannose", atașate la asparagină, de genul celor găsite la asparagina 402 și 563 din lanțul μ (40), (41).

Prin întrebuințarea endoglicozidazei D din *D. pneumoniae* (38) a reieșit că îndepărtarea unor părți din structurile oligozaharidice de tip complex, ramificate, ar conduce în mod paradoxal la o mărire a rezisten-

ţei la proteoliză. Dar modul de scindare este dependent de enzima proteolitică (36) întrebuinţată ulterior glicozidazelor. Alegerea tripsinei nu a fost cea mai potrivită în cazul nostru, deoarece tripsina poate da complexe cu unele proteine, cu o activitate modificată faţă de cea iniţială (42) (M. Andras, Z. Moldoveanu, date comunicate personal). Cum noi am întrebuinţat un amestec glicozidazic, nu este exclus ca acest fenomen să fi avut loc în cazul probei cu ambele enzime prezente (38).

Am obţinut atunci fragmentul de greutate moleculară semnalat de Kobayashi şi colab. (36) la acţiunea tripsinei; nu am obţinut fragmentul de 25 000 din cauza timpului prelungit de acţiune (18 ore, în loc de 4 ore).

În această lucrare am întrebuinţat un preparat de SC care prezintă mai degrabă agregatele semnalate de Brandtzaeg (17) decît polimerii de SC sugeraţi de Van Munster (citat în (15)). Fragmentul obţinut prin acţiunea proteazelor din *Streptomyces griseus* şi prin acţiunea catepsinei B_1 este asemănător celui dat de enzimele proteolitice întrebuinţate de Kobayashi, şi anume fragmentul cu greutatea moleculară de 45 000, semnalat de asemenea şi de Brandtzaeg (17).

Fragmentul cu migrare rapidă de la proba acţiunii cuplate a celor două tipuri de enzime este foarte asemănător cu fragmentul de 15 000 greutate moleculară, semnalat de Kobayashi şi colab. după acţiunea subtilizinei (36).

Deoarece fragmentul de 45 000 este foarte rezistent la proteoliză (36), (37), reiese că acţiunea catepsinei ulterioară celei a enzimelor din amestecul glicozidazic are loc numai asupra SC intacte sau agregate, măsă în soluţie. Acestea trebuie să fi fost modificate de glicozidaze, deoarece scindarea a avut loc în alt mod decît prin acţiunea singulară a catepsinei.

Prezenţa fragmentului cu greutate moleculară 45 000 este obişnuită în preparatele de colostru post-partum, ceea ce indică o acţiune *in vivo* a proteazelor din organism asupra SC (17). Obţinerea fragmentului sub acţiunea catepsinei B_1, enzimă lizozomală, aduce un argument în favoarea acestei presupuneri.

Se poate afirma că în molecula SC se găsesc atît structuri oligozaharidice complexe şi ramificate (38), cît şi structuri oligozaharidice simple de tip „core", şi nu de tip mucină, deoarece în SC nu este prezentă β-N-acetilgalactozamina.

Lanţurile de tip simplu conferă moleculelor de SC rezistenţă la proteoliză, pe cînd lanţurile complexe intacte nu le apără de acţiunea proteazei. Acest mod diferit de comportare se poate datora fie solubilităţii crescute a preparatelor cu lanţuri complexe, care sînt astfel mai uşor atacabile de către proteaze, fie repartizării inegale a grupărilor glucidice pe suprafaţa moleculei de SC.

CONCLUZII

Endoglicozidazele din *Streptomyces griseus* au modificat molecula componentei secretoare, acţionînd asupra structurilor oligozaharidice simple de tip „core" sau „high mannose". Schimbările conformaţionale

care au loc prin scoaterea unei părți glucidice conferă moleculei de SC o susceptibilitate mai mare la hidroliza cu catepsina B_1, punînd în evidență un fragment anodic cu greutate moleculară mică.

Prezentat la redacție
la 10 decembrie 1979

Institutul de științe biologice,
Departamentul de biochimie,
Colectivul de proteine
București, Splaiul Independenței nr. 296
și
**Institutul de cercetări chimico-farmaceutice*
București, Calea Vitan 112

THE ROLE OF CARBOHYDRATE MOIETY IN THE INTRACELLULAR DEGRADATION OF GLYCOPROTEINS. X. HYDROLYSIS WITH CATHEPSIN B_1 OF SC TREATED WITH *STREPTOMYCES GRISEUS* GLYCOSIDASES

SUMMARY

The effect of endoglycosidases isolated from *Streptomyces griseus* on the cathepsin hydrolysis pattern of a secretory component was followed by disc-electrophoresis, immunoelectrophoresis, immunodiffusion and crosselectrophoresis. The alterations of the secretory component plead in this way for a change of the secretory component conformation so that it becomes susceptible to the proteolytic action and releases a small anodic fragment.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Brandtzaeg, J. Immunol., **112**, 1553 (1974).
2. E. Lindh, I. Bjork, Eur. J. Biochem., **62**, 271 (1976).
3. P. Brandtzaeg, Acta path. microbiol. scand., B, **79**, 189 (1971).
4. W. R. Brown, R. W. Newcomb, K. Ishizaka, J. clin. Invest., **49**, 1374 (1970).
5. B. J. Underdown, K. J. Dorrington, J. Immunol., **112**, 949 (1974).
6. V. Gheție, G. Moța, Immunochemistry, **10**, 839 (1973).
7. J. F. Heremans, în *The Antigens*, ed. M. Sela, vol. 2, Academic Press, New York, 1974, p. 365.
8. M. E. Lamm, Advanc. Immunol., **22**, 223 (1976).
9. J. L. Winkelhake, Immunochemistry, **15**, 695 (1978).
10. P. Brandtzaeg, Adv. exp. Med. Biol., **45**, 87 (1974 a).
11. T. B. Tomasi, J. Bienenstock, Advanc. Immunol., **9**, 1 (1968).
12. M. Tomana, J. Mestecky, W. Niedermeier, J. Immunol., **108**, 1631 (1972).
13. M. E. Lamm, J. Greenberg, Biochemistry, **11**, 2744 (1972).
14. J. Mestecky, J. Zikan, W. T. Butler, R. Kulhavy, Immunochemistry, **9**, 883 (1972).
15. P. J. J. Van Munster, G. B. A. Stoelinga, J. R. Clamp, J. J. T. Gerding, J. C. M. Reijnen, M. Voss, Immunology, **24**, 249 (1972).
16. K. Kobayashi, Immunochemistry, **8**, 785 (1971).
17. P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **12**, 877 (1975).
18. K. Sletten, T. B. Christensen, P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **12**, 783 (1975).
19. N. Koide, T. Muramatsu, J. biol. Chem., **249**, 4897 (1974).
20. A. L. Tarentino, F. Maley, J. biol. Chem., **249**, 811 (1974).
21. M. K. Bach, J. R. Brashler, J. Immunol., **110**, 1599 (1973).
22. R. W. Newcomb, D. Normansell, D. R. Standworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
23. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. W. Kraus, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
24. H. Lovenstein, A. Jngild, Anal. Biochem., **71**, 204 (1976).
25. C. Mușolan, S. Vasu, St. cerc. biochim., **20**, 209 (1977).

26. A. J. Barrett, Biochem. J., **117**, 601 (1970).
27. A. J. Barrett, Biochem. J., **131**, 809 (1973).
28. H. Meninger, Immunochemistry, **13**, 633 (1976).
29. J. Scheidegger, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
30. O. Ouchterlony, Acta path. scand., **32**, 231 (1953).
31. B. J. Davis, N. Y. Acad. Sci., **121**, 373 (1964).
32. P. O. Ganrot, Scand. J. clin. Invest., 29 Suppl., **124**, 39 (1972).
33. J. R. Clamp, J. Johnson, în *Glycoproteins*, ed. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 1972, p. 612.
34. R. W. Olafson, L. B. Smillie, Biochemistry, **14**, 1161 (1975).
35. K. D. Vosbeck, B. D. Greenberg, M. S. Ochoa, P. L. Whitney, W. M. Award, J. biol. Chem., **253**, 257 (1978).
36. K. Kobayashi, J. P. Vaerman, J. F. Heremans, Immunochemistry, **10**, 73 (1973).
37. L. Buzilă, C. Motaş, Rev. roum. Biochim., **14**, 155 (1977).
38. L. Buzilă, F. Mihalcu, C. Motaş, St. cerc. biochim., **21**, 137 (1978).
39. M. Arakawa, T. Muramatsu, J. Biochem., **76**, 307 (1974).
40. J. Jouanneau, R. Bourrillon, Immunochemistry, **13**, 991 (1976).
41. J. Baenziger, J. Kornfeld, J. biol. Chem., **249**, 7270 (1974).
42. Y. Counitchanski, G. Berthiller, R. Got, Clin. chim. Acta, **30**, 83 (1970).

STUDII PE LIPOZOMI. I. INCLUDEREA β-GALACTOZIDAZEI DIN *PHASEOLUS VULGARIS*

VICTORIA DOBRE, C. DIMITRIU, FLORICA CHELU

Rezumat. Studiile realizate pe lipozomi separaţi din lecitină parţial purificată din gălbenuş de ou şi colesterol pur, cu sau fără includere de extract glicozidazic din *Phaseolus vulgaris*, au urmărit variaţia compoziţiei lipidice, mărimea fracţiunilor lipozomale, randamentul de includere a β-galactozidazei conţinute în extractul enzimatic şi separarea lipozomilor de proteina neinclusă. Rezultatele obţinute arată raportul optim (7 : 1) de lecitină : colesterol, scăderea randamentului de includere (de la 75 la 40%) cu creşterea timpului de sonicare la 10 minute, separarea eficientă prin gel-filtrare pe coloană de Sepharose 6 B atît a lipozomilor după mărime cît şi de enzima neinclusă şi vizualizarea fracţiunilor de lipozomi prin microscopie optică şi electronică.

Odată cu descoperirea bolilor de stocare, a căror etiologie era deficienţa uneia sau a mai multor enzime lizozomale, prin lipsă de sinteză sau disfuncţie, s-a ridicat problema posibilităţii unei terapii de substituţie (1)—(3). O astfel de terapie prezintă însă o serie de dificultăţi, generate de prezenţa enzimei libere în circulaţie, între care antigenicitatea rămîne cea esenţială. O rezolvare eficientă a acestui impediment este separarea enzimei în curentul circulator prin includerea ei în formaţiuni artificiale de tipul lipozomilor. Folosirea lipozomilor drept „carrier" enzimatici poate preveni enzima de inactivare imunologică (4), (5) şi de asemenea, prin învelirea cu imunoglobuline specifice, creează posibilitatea unui mecanism de direcţionare a enzimei către lizozomii ţesutului specific, unde aceasta este deficientă (6)—(8).

Dacă sechestrarea enzimei în lipozomi rezolvă problema antigenicităţii, rezultă că pentru includere se pot folosi şi componente care sînt depărtate antigenic. Ne-am gîndit că extractul glicozidazic din *Ph. vulgaris* ar putea fi o sursă pentru β-galactozidază (9), enzimă deficientă în bolile genetice lizozomale tip Hunter şi Hurler (2).

În lucrarea de faţă prezentăm unele dintre rezultatele obţinute cu lipozomi preparaţi din lecitină parţial purificată din gălbenuş de ou şi colesterol pur, conţinînd extract glicozidazic din *Ph. vulgaris*.

MATERIAL ŞI METODE

Lecitina a fost parţial purificată din gălbenuş de ou (10). Colesterolul a fost un produs pur, Chinoin-Budapest. Pentru obţinerea extractului glicozidazic s-au folosit cotiledoanele boabelor de *Phaseolus vulgaris*, varietatea Great Northern (11), germinate timp de 6 zile.

Sonicarea a fost realizată la sonicatorul MSE, nivel de amplitudine 6.

Prepararea lipozomilor s-a făcut utilizîndu-se diferite raporturi molare de lecitină : colesterol (12) şi evaporatorul rotativ Rotadest.

În rezumat, lipidele sînt dizolvate în cloroform, care este ulterior îndepărtat prin evaporare rotativă la 37°C. Filmul lipidic obţinut este dispersat cu tampon citrat 0,05 M, pH 4,6 cu sau fără enzimă ; lipozomii obţinuţi sînt supuşi sau nu sonicării, în funcţie de scopul experimentului.

Gel-filtrarea pe Sepharose 6 B a fost realizată conform metodei lui Gregoriadis şi colab. (13). Condiţiile de eluţie sînt prezentate în explicaţia figurilor.

Determinarea randamentului de includere în lipozomi a β-galactozidazei conţinute în extractul glicozidazic s-a făcut conform metodologiei generale (12) modificate. În rezumat, se determină activitatea enzimei neincluse (pe lipozomi ca atare) şi a celei totale (pe lipozomi sparţi cu Triton X—100). Prin diferenţă se obţine activitatea enzimei incluse (latentă), care este calculată procentual faţă de cea totală, luată drept 100.

Pentru determinarea activităţii enzimei am folosit substratul specific o-nitro-fenil-β-D-galactopiranozid 25 mM şi o curbă standard de 0,01—0,1 μmoli p-nitrofenol (11).

Microscopie optică şi electronică. La microscopul optic, probele lipozomale au prezentat acelaşi contrast, cu sau fără colorare cu OsO_4.

Imaginile electronomicroscopice au fost realizate prin tehnica de colorare cu acid fosfotungstic (14), (15), folosind microscopul electronic tip Philips sau Jem 7.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Componenţii lipidici majori utilizaţi la formarea stratului bimolecular lipozomal sînt lecitina şi colesterolul ; în timp ce lecitina furnizează matricea bidimensională a membranei, ultimul influenţează fluiditatea şi permeabilitatea membranei, grupul său 3-β-hidroxi interacţionînd cu porţiunile intramembranare ale proteinelor (16).

Am utilizat diferite raporturi molare lecitină : colesterol, respectiv (3 : 1), (7 : 2), (7 : 1), ultimul fiind cel optim găsit din punctul de vedere al determinării randamentului de includere.

Tabela 1

Randamentul de includere a β-galactozidazei în lipozomi, obţinut prin metoda spargerii lipozomilor cu Triton X—100

Timp de sonicare (minute)	% includere ($\bar{M} \pm E_s$)
2	75*
5	41 ± 5,5
10	46 ± 8,0

* Numărul determinărilor nu a permis efectuarea calculului statistic.

Tabela 1 redă valorile randamentului de includere a β-galactozidazei în lipozomi preparaţi din lecitină : colesterol (7 : 1), la diferiţi timpi de sonicare a suspensiei lipozomale. Pentru spargerea lipozomilor am încercat Na-dodecilsulfatul 0,1—1%, cu rezultat negativ, şi Triton X — 100 0,1—4%, concentraţie găsită eficientă.

Din datele tabelei apare un procent crescut de includere a enzimei, care scade aproape la jumătate prin creşterea timpului de sonicare (de la 75% la 2 minute sonicare la 41 şi 46% la 5 şi, respectiv, 10 minute sonicare).

Braidman şi Gregoriadis (9), lucrînd cu Triton X — 100 0,8% în concentraţie finală în proba lipozomală, găsesc un procent de includere a β-glucozidazei, din extract hidrolazic de placentă, de aproape 100%.

Rezultatele obţinute au o semnificaţie deosebită. Scăderea la jumătate a includerii prin sonicare şi menţinerea acestei scăderi la 5 şi 10 minute sonicare semnalează faptul că procentul major de includere se realizează în spaţiul central apos al lipozomilor. Celelalte straturi sînt distruse la sonicare, motiv pentru care sonicarea reprezintă un mod frecvent de obţinere a lipozomilor unilamelari din multilamelari (17).

Sînt specificate în literatură dificultăţile întîmpinate la spargerea lipozomilor cu diferiţi detergenţi în vederea determinării randamentului de includere a produsului activ înglobat (9), (18).

Esenţial de semnalat este faptul că spargerea membranei lipozomale prin detergent este o problemă complexă, dependentă de penetrarea, solubilitatea şi puterea distructivă de membrană a detergentului, pe de o parte, iar pe de altă parte de timpul şi de componenţii membranei lipozomale şi ai produsului inclus. Ca atare valorile obţinute sînt necesare a fi interpretate cu mare grijă. Din motivele expuse, noi am pus la punct o metodă, care va fi publicată în detaliu, pentru determinarea randamentului de includere a enzimelor în lipozomi pe bază de reacţie imună cu ser imun specific.

Omogenitatea lipozomilor după mărime poate fi urmărită prin gel-filtrare, prin microscopie electronică şi prin constanta de sedimentare la ultracentrifugare (14). Am utilizat primele două metode pentru fracţionarea lipozomilor după mărime şi vizualizarea acestora.

Figura 1 prezintă fracţiunile lipozomale obţinute prin gel-filtrarea lipozomilor lecitină : colesterol (7 : 1), preparaţi cu tampon citrat 0,05 M, pH 4,6 şi sonicaţi 5 minute. Curba de eluţie, obţinută prin citiri de turbi-

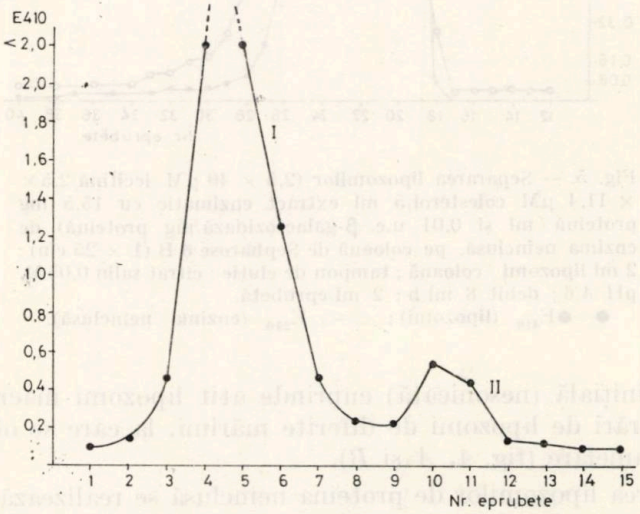


Fig. 1. — Fracţionarea lipozomilor (40 μM lecitină/11,4 μM colesterol/2 ml tampon citrat 0,05 M, pH 4,6) sonicaţi 5 minute, pe coloană de Sepharose 6B (1 × 25 cm) ; 1 ml lipozomi/coloană ; tampon de eluţie : citrat salin 0,05 M, pH 4,6 ; debit 2 ml/h ; 2 ml/eprubetă.

ditate datorate lipidelor la 410 nm (13), a evidenţiat două fracţiuni de mărimi diferite.

Diferenţa de mărime a celor două fracţiuni lipozomale a fost confirmată prin microscopie electronică (fig. 2 şi 3). În cadrul fiecărei fracţiuni, imaginile electronomicroscopice evidenţiază o uşoară neomogenitate, datorită dimensiunii (1 × 25 cm) şi debitului coloanei (2 ml/h), care deter-

mină o curbă de eluţie specifică. Prezenţa a două mărimi în fracţiunea II apare evidentă în figura 3. La timpul de sonicare de 5 minute a probei iniţiale, ambele fracţiuni conţin lipozomi unilamelari.

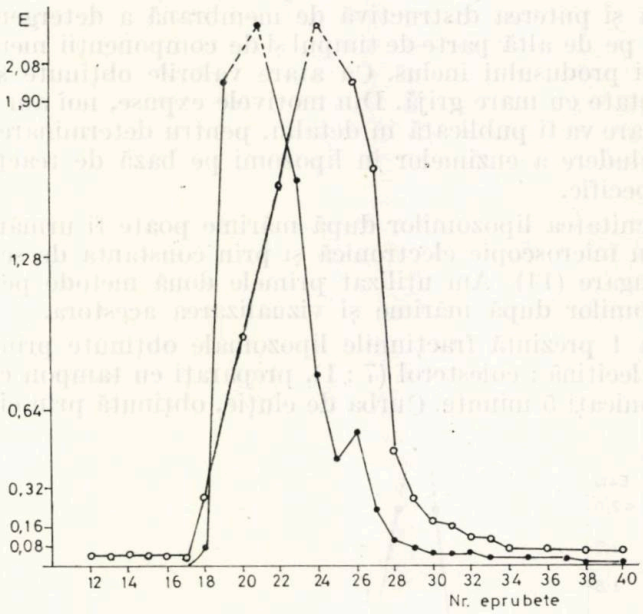


Fig. 5. — Separarea lipozomilor (2,5 × 40 μM lecitină/2,5 × × 11,4 μM colesterol/5 ml extract enzimatic cu 15,5 mg proteină / ml şi 0,01 u.e. β-galactozidază/mg proteină) de enzima neinclusă, pe coloană de Sepharose 6 B (1 × 25 cm); 2 ml lipozomi / coloană; tampon de eluţie: citrat salin 0,05 M, pH 4,6; debit 8 ml/h; 2 ml/eprubetă.
●—● E_{410} (lipozomi); ○—○ E_{280} (enzima neinclusă).

Proba iniţială (nesonicată) cuprinde atît lipozomi macroveziculari, cît şi aglomerări de lipozomi de diferite mărimi, la care se observă straturile multilamelare (fig. 4, *A* şi *B*).

Separarea lipozomilor de proteina neinclusă se realizează prin ultracentrifugare sau prin gel-filtrare (13). Figura 5 redă separarea lipozomilor conţinînd enzimă de enzima neinclusă, prin gel-filtrare pe Sepharose 6 B.

Curbele de eluţie au fost obţinute prin citirea eluatelor coloanei la 410 şi 280 nm. Aspectul foarte strîns al celor două curbe arată că debitul de 8 ml/oră utilizat a fost totuşi crescut, cu toate că reglarea acestuia a fost făcută şi înainte de încărcarea coloanei cu proba lipozomală. De fapt, noi am încercat fixarea unui debit de 1,3 ml/oră (14), apropiat celui din figura 1, dar reglarea debitului depinde şi de încărcătura coloanei; spre deosebire de datele din figura 1, în cazul de faţă am utilizat lipozomii mai mari (nesonicaţi).

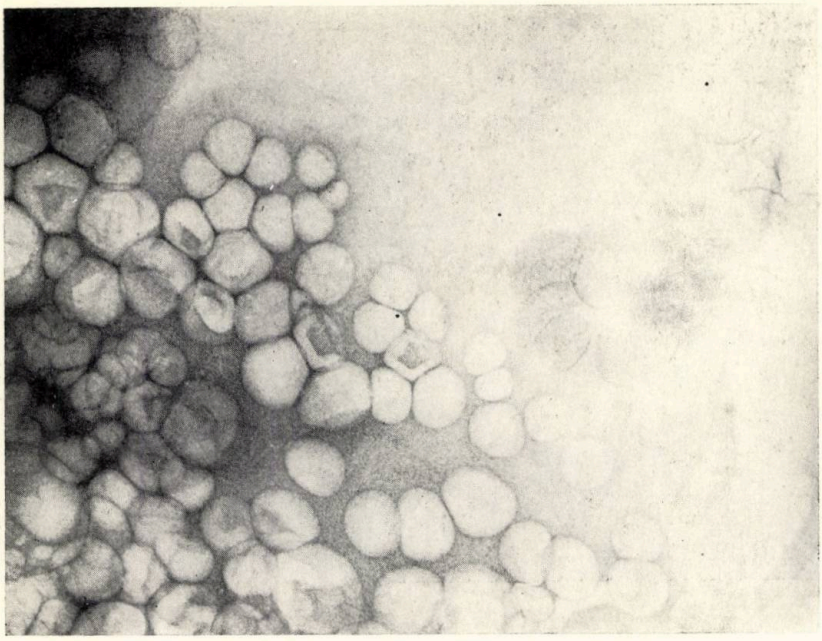


Fig. 2 : fracțiunea I (× 165 000).

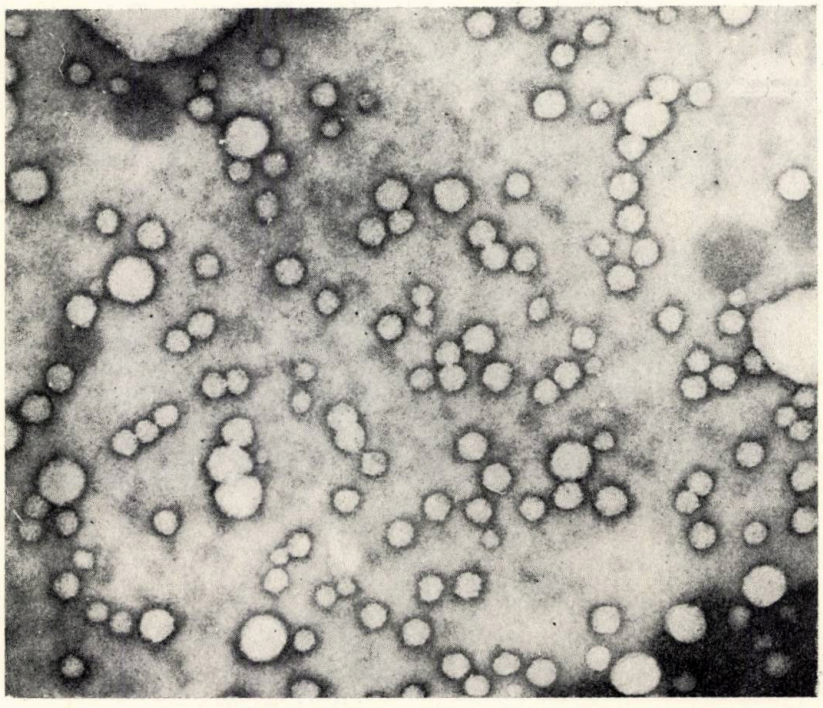
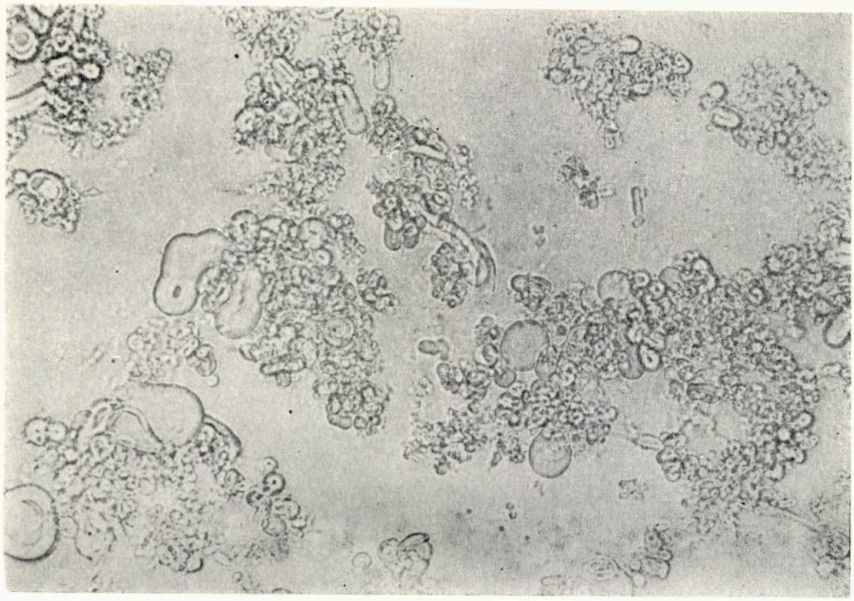


Fig. 3 : fracțiunea II (× 120 000).

Fig. 2 și 3. — Imagini electronomicroscopice reprezentînd lipozomi fracționați pe coloană. Compartimentele apoase apar opace la electroni.

a



b

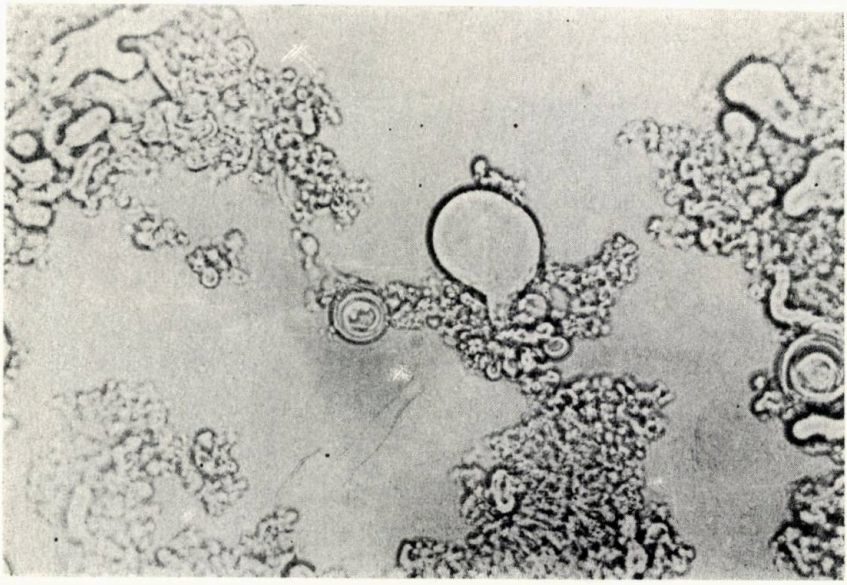


Fig. 4. — *A* și *B*, Imagini realizate la microscopul optic reprezentînd lipozomi preparați cu tampon citrat, nesonicați, neseparați pe coloană.
A, × 400 ; *B*, × 1 000.

CONCLUZII

Lucrarea prezintă rezultate originale asupra includerii β-galactozidazei, enzimă deficientă în bolile genetice lizozomale de tipul mucopolizaharidozelor. Includerea β-galactozidazei în lipozomi a fost realizată utilizînd extract glicozidazic din *Phaseolus vulgaris*, care a conținut enzima luată în studiu. Raportul optim de includere se realizează în lipozomii preparați din lecitină parțial purificată din gălbenuș de ou și colesterol pur în raport molar (7 : 1). Randamentul de includere a enzimei variază între 75 și 46% la 2 și, respectiv, 10 minute de sonicare a probei lipozomale. Prin gel-filtrare pe Sepharose 6 B a fost realizată separarea lipozomilor conținînd enzimă de enzima neinclusă.

În lucrare sînt prezentate de asemenea studii pe lipozomi conținînd tamponul enzimei, citrat 0,05 M, pH 4,6. Gel-filtrarea pe Sepharose 6 B a acestui tip de lipozomi sonicați 5 minute a evidențiat două fracțiuni lipozomale. Prin microscopie electronică, în cadrul fiecărei fracțiuni au fost evidențiate mărimea lipozomilor și prezența numai a celor unilamelari. Prin microscopie optică, aceeași probă lipozomală, înainte de sonicare și gel-filtrare, a conținut și lipozomi multilamelari, pe lîngă cei unilamelari.

Prezentat la redacție
la 15 decembrie 1979

Institutul de științe biologice
București, Splaiul Independenței nr. 296

STUDIES ON LIPOSOMES. I. THE ENTRAPMENT OF *PHASEOLUS VULGARIS* β-GALACTOSIDASE

SUMMARY

Studies carried out in our laboratory on artificial cells (liposomes) containing *Phaseolus vulgaris* β-galactosidase show the following results : the (7 : 1) phosphatidylcholine/ cholesterol optimum ratio and the decrease of enzyme entrapment by 50% with the sonication time ; a good separation, by using a Sepharose 6 B column, of enzyme-containing liposomes from the excess free enzyme and the size fractions too ; an easy evidentiation of liposomes by optic and electron microscopy techniques.

BIBLIOGRAFIE

1. *Enzyme therapy in lysosomal storage diseases*, ed. J. M. Tager, G. T. M. Hooghwinkel, W. Th. Daems, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1974.
2. *Lysosomes and storage diseases*, ed. H. G. Hers, F. Van Hoof, Academic Press, New York, 1973.
3. R. J. Uren, E. R. Handschumacher, *Enzyme therapy in "Cancer" a comprehensive treatise*, ed. F. F. Becker, Plenum Press, New York, vol. 5, 1977.
4. G. Gregoriadis, E. D. Neerunjun, Eur. J. Biochem., **47**, 179 (1974).
5. Diane E. Neerunjun, G. Gregoriadis, Biochem. Soc. Trans., **4**, 133 (1976).

6. G. Gregoriadis, Diane E. Neerunjun, Biochem. Biophys. Res. Commun., **65**, 537 (1975).
7. L. Huang, J. S. Kennel, Biochemistry, **18**, 1702 (1979).
8. G. Weissman, H. Korkhak, M. Finkelstein, J. Smolen, S. Hoffstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., **308**, 235 (1978).
9. J. P. Braidman, G. Gregoriadis, Biochem. J., **164**, 439 (1977).
10. M. C. Pangborn, J. biol. Chem., **188**, 471 (1951).
11. Ecaterina Ilica, St. cerc. biochim., **19**, *1*, 43 (1976).
12. G. Gregoriadis, Meth. Enzymol., **44**, 218 (1976).
13. G. Gregoriadis, P. D. Lethwood, Brenda E. Ryman, Febs Lett., **14**, 95 (1976).
14. C. Huang, Biochemistry, **8**, 344 (1969).
15. S.M. Johnson, A. D. Bangham, Biochim. biophys. Acta, **193**, 8 (1969).
16. D. S. Friend, P. M. Elias, J. Cell Biol., **79**, 216 (1978).
17. F. Puisieux, T. T. Luong, A. Moufti, Pharm. Acta Helv., **52**, *12*, 305 (1977).
18. F. P. Bonventre, G. Gregoriadis, Antimicrobial Agents for Chemotherapy, **13**, *6*, 1049 (1978).

DINAMICA APARIŢIEI ŞI PERSISTENŢEI IMUNOGLOBULINEI A SECRETOARE ŞI LACTOFERINEI ÎN SALIVA PERSOANELOR CU INFECŢII REPETATE, VACCINATE CU BRONHODIN

ELENA GANEA, ZINA MOLDOVEANU, RODICA RADU, V. FILIP, E. SEROPIAN

Rezumat. S-au determinat valorile SIgA şi lactoferinei în saliva pacienţilor cu infecţii repetate ale căilor respiratorii înainte şi în cursul tratamentului cu Bronhodin. Rezultatele arată prezenţa unei deficienţe atît de SIgA cît şi în lactoferină. Tratamentul cu Bronhodin a dus la o creştere a ambilor parametri, după o curbă ondulatorie. Valorile maxime s-au înregistrat la 45—60 de zile de la începerea tratamentului. Aceste date sînt într-o bună concordanţă cu rezultatele clinice.

Frecvenţa mare a afecţiunilor căilor respiratorii, mai ales la copii, se datoreşte în bună măsură ineficienţei mecanismelor de apărare locală sau generală. Scăderea apărării antiinfecţioase se poate corecta prin imunostimulare în scopul intensificării răspunsului imun, ajutînd astfel la ameliorarea sau vindecarea bolii. Folosirea ca imunostimulatoare a unor produse bacteriene a constituit una din preocupările Centrului de alergologie din Bucureşti.

Dintre acestea, Bronhodinul, produs cu o mare complexitate antigenică, fiind un amestec de 9 specii microbiene, a fost administrat pe scară largă în diverse afecţiuni ale căilor respiratorii. Rezultatele clinice obţinute au fost bune şi foarte bune în 68—77% din cazuri (1), la copii ajungîndu-se la 94,6% rezultate excelente şi foarte bune (2). De asemenea, s-au semnalat modificări ale răspunsului imun general, administrarea Bronhodinului ducînd la creşterea activităţii bactericide a serului, a titrului de anticorpi aglutinanţi corespunzător germenilor prezenţi în formula Bronhodinului şi a activităţii bactericide a polimorfonuclearelor în sînge şi a titrului de imunoglobuline din ser (3).

Deosebit de importantă este însă şi apărarea locală a sistemului respirator. Mecanisme imunologice specifice şi nespecifice, umorale şi celulare, precum şi mecanismele neimunologice acţionează la nivelul tuturor mucoaselor, inclusiv mucoasa respiratorie. Imunitatea locală a mucoasei respiratorii este asigurată cu preponderenţă de anticorpii SIgA în saliva persoanelor cu infecţii repetate ale căilor respiratorii. Modificările SIgA în timpul tratamentului cu Bronhodin reprezintă un mijloc de urmărire a eficienţei tratamentului, a perioadei şi a cantităţii optime de administrare mai fidel şi mai specific decît modificările imunoglobulinelor serice. Astfel de date împreună cu rezultatele privind modificările lactoferinei, component al sistemului de apărare locală neimunologic, vor contribui totodată la înţelegerea modului în care acţionează aceşti factori la nivelul mucoaselor.

St. cerc. biochim., 23, 1, 27—36 (1980)

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe un lot de 24 de bolnavi cu infecţii repetate ale căilor respiratorii, adulţi şi copii, aflaţi sub controlul Centrului de alergologie din Bucureşti. Pacienţilor li s-a administrat Bronhodin în doze crescînde după schema de imunostimulare (4).

Saliva totală s-a recoltat pe mertiolat 0,01%, înainte, în cursul şi după tratament, pe o perioadă totală de 6 luni.

Prelucrarea salivei. Saliva totală nestimulată s-a centrifugat 20 min la 2 000 r.p.m., la 4°C. Supernatantul s-a păstrat îngheţat pînă în momentul cînd s-au făcut determinările.

Prepararea şi purificarea SIgA, SC şi lactoferinei. Din colostru uman delipidat prin centrifugare 2 ore la 20 000 r.p.m. şi decazeinizat prin precipitare cu acid acetic 2% s-au preparat SIgA după metoda lui Mestecky şi colab. (5) şi lactoferină după o modificare a metodei lui Johansson (6). SC s-a preparat din laptele uman după metoda lui Newcomb şi colab. (7). Aceste preparate au fost necesare atît pentru realizarea curbelor standard cît şi pentru prepararea de antiseruri.

Prepararea serurilor imune. S-au obţinut seruri imune anti-SIgA, anti-SC şi antilactoferină injectîndu-se intradermic produsele preparate şi purificate de noi. Injectările au fost făcute în două reprize la intervale de 2 săptămîni. Pentru o repriză s-au injectat 1—2 mg proteină în 0,5 ml ser fiziologic, emulsionată cu un volum egal de adjuvant Freund complet (0,85 volume Bayol F + 0,15 volume Arlacel A şi micobacterii omorîte). Sîngerarea de probă pentru verificarea apariţiei anticorpilor s-a făcut din ureche la 10 zile de la a doua injectare. Dubla difuzie radială a evidenţiat apariţia liniilor de precipitare între antigenul injectat (SIgA, SC şi lactoferină) şi serul obţinut.

Determinarea proteinelor totale în salivă s-a făcut după metoda Lowry (8). Pentru concentraţii proteice foarte mici, susceptibile la erori prin metoda Lowry, determinările s-au verificat pin metoda Bradford (9).

Determinarea cantitativă a SIgA în salivă s-a realizat printr-o modificare a metodelor lui Mancini (10) şi Fahey (11).

Imunodifuzia probelor s-a realizat în gel de agaroză 1% conţinînd ser anti-SIgA în proporţie de 5%; difuzia a avut loc timp de 24 de ore la temperatura camerei. Curba etalon s-a realizat cu SIgA preparat de noi din colostru uman, reprezentînd diametrul inelului de precipitare pe abscisă şi logaritmul concentraţiei SIgA pe ordonată.

Determinarea lactoferinei. Prezenţa lactoferinei în salivă a fost evidenţiată prin dubla difuzie radială după Ouchterlony (12).

Conţinutul de lactoferină a fost apreciat printr-o modificare a metodei lui Mancini (10).

Difuzia probelor s-a făcut în gel de agaroză 1% în tampon veronal 0,05 M, pH 8,2 lactat de calciu 2 mM, conţinînd serul antilactoferină în proporţie de 1/100 ml antiser/ml gel.

Curba etalon s-a realizat cu lactoferină preparată de noi din colostru uman, reprezentînd aceiaşi parametri ca şi la SIgA.

Dubla difuzie radială s-a realizat în gel de agaroză 1% în ser fiziologic, după metoda lui Ouchterlony (12), folosind serurile imune anti-SIgA, anti-SC, anti-IgA seric şi antilactoferină.

Imunoelectroforeza salivei s-a efectuat în gel de agaroză 1% în tampon veronal 0,05 M, pH 8,6. S-au folosit antiserurile: antiser sanguin total, antialbumină serică umană, anti-colostru uman şi anti-SIgA uman. Migrarea electroforetică a avut loc la 1 mA/cm şi 200 V.

Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă. Probe de salivă (100/µl) s-au supus în duplicat disc-electroforezei în gel de poliacrilamidă după metoda lui Davis (13). Migrarea a avut loc cu 3 mA/tub şi 200 V.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dinamica apariţiei şi persistenţei SIgA în saliva pacienţilor trataţi cu Bronhodin

Concentraţia SIgA s-a exprimat în funcţie de concentraţia proteinelor totale din salivă (mg SIgA/100 mg proteine totale), pentru a evita posibilele erori datorate gradului diferit de diluţie a salivei. Cu excepţia lui Mandel şi colab. (14), care raportează valorile SIgA la cele

ale potasiului, majoritatea autorilor exprimă SIgA în secreţii ca mg/ml sau mg/100 ml, dînd naştere unor intervale de valori normale foarte variate (15), (16), (17).

Rezultatele obţinute arată valori scăzute ale SIgA înainte de tratament (media = 10,93 mg SIgA / 100 mg proteină) la majoritatea pacienţilor, confirmînd existenţa unei tendinţe crescute la infecţii respiratorii repetate în cazul persoanelor deficiente în SIgA (18). Un singur pacient, *I.M.*, a prezentat SIgA în limite normale (24 mg/100 mg proteină), ceea ce sugerează faptul că nu totdeauna infecţiile respiratorii sînt însoţite de o deficienţă a SIgA.

La numai două săptămîni de la prima administrare de Bronhodin, perioadă în care s-au administrat la fiecare trei zile doze crescînde, anticorpii SIgA prezintă valori semnificativ crescute, media întregului lot fiind 18,56 mg SIgA/100 mg proteină. Într-un singur caz, la pacienta *B.A.C.*, întîlnim o scădere, care poate fi explicată prin modul diferit de administrare, şi anume aceasta a primit un tratament de hiposensibilizare, spre deosebire de toţi ceilalţi pacienţi, care au fost trataţi prin imunostimulare.

Valorile medii ale SIgA pentru întregul lot, calculate separat pentru fiecare recoltare, sînt date în continuare :

I recoltare . . . . . 10,93 mg SIgA/100 mg proteină
a II-a recoltare (2 săptămîni) . . . 18,56 mg SIgA/100 mg proteină
a III-a recoltare (1 lună) . . .17,21 mg SIgA/100 mg proteină
a IV-a recoltare (6 săptămîni)...23,57 mg SIgA/100 mg proteină
a V-a recoltare (2 luni) . . . .25,00 mg SIgA/100 mg proteină
a VI-a recoltare (3 luni) . . . .24,84 mg SIgA/100 mg proteină
a VII-a recoltare (4 luni) . . .30,16 mg SIgA/100 mg proteină
a VIII-a recoltare (5 luni) . . .23,94 mg SIgA/100 mg proteină
a IX-a recoltare (6 luni) . . . 15,40 mg SIgA/100 mg proteină

Din aceste date se observă că, la o lună de la începerea tratamentului, concentraţia SIgA în salivă scade nesemnificativ în raport cu nivelul de la două săptămîni. Această valoare este însă rezultatul unor tendinţe diferite la fiecare pacient, aşa cum se vede în figura 1.

Semnalăm deci, la tratamentul cu Bronhodin, existenţa unui răspuns ce diferă uneori şi de la individ la individ. Acest lucru este valabil şi pentru recoltările următoare, la 2, 3, 4, 5 şi 6 luni.

Totuşi, revenind la valorile medii, se înregistrează o creştere importantă la 6 săptămîni, urmată de un maxim la 2 luni şi de un al doilea maxim la 4 luni.

În continuare, valorile scad, astfel că după 6 luni concentraţia SIgA rămîne totuşi la un nivel superior celui iniţial (15,40 faţă de 10,93 mg/100 mg proteină).

Ţinînd seama de dinamica valorilor medii, date anterior, şi de variaţiile individuale (fig. 1), putem spune că răspunsul în anticorpi SIgA la vaccinarea cu Bronhodin are un mers ondulatoriu, prezentînd în general două maxime, al doilea mai înalt decît primul. Cel de-al doilea maxim este atins la unii pacienţi după 3 luni (*B.A.*, *S.C.*, *G.S.*), la alţii după 4 luni (*P.F.*, *M.A.*, *B.A.C.*). În funcţie de aceste date se poate considera perioada de 3 luni de tratament ca absolut necesară, determi-

nările ulterioare de SIgA în salivă indicînd utilitatea continuării tratamentului sau a stopării lui.

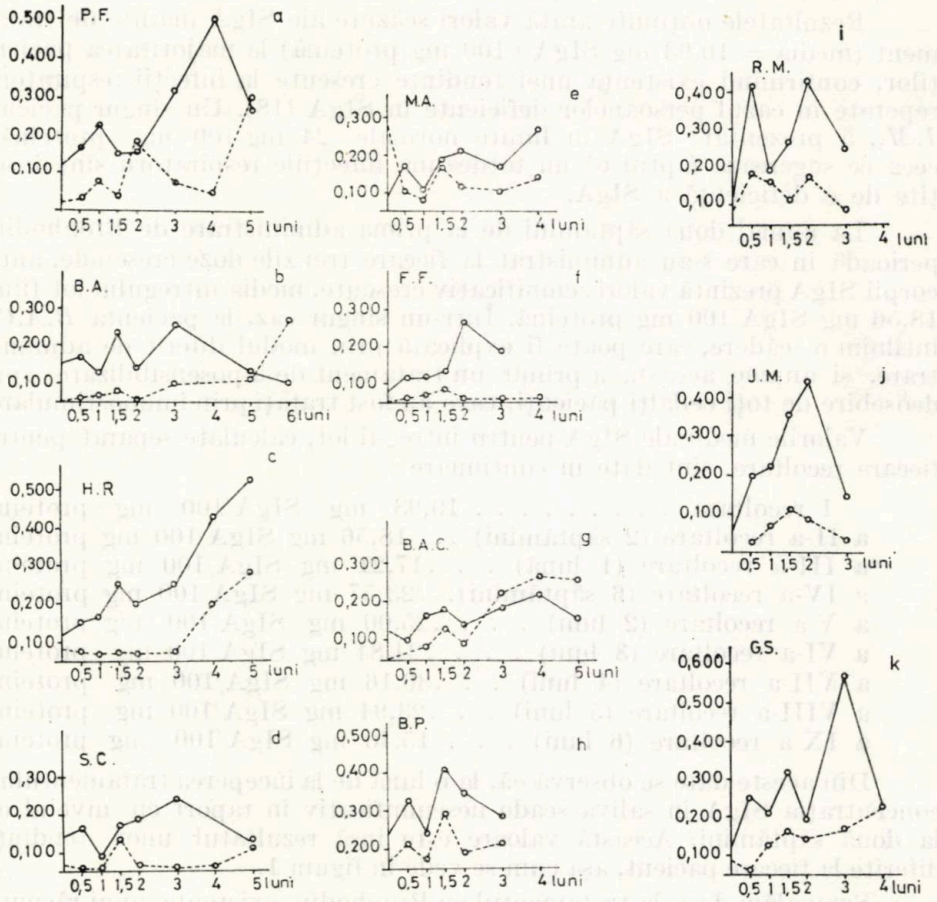


Fig. 1. — Dinamica valorilor SIgA (——) şi lactoferinei (- - - -) în saliva pacienţilor cu afecţiuni ale căilor respiratorii, înainte şi în cursul tratamentului cu Bronhodin.

Rezultatele obţinute în laborator au fost în concordanţă cu datele clinice, care au arătat o evoluţie bună, foarte bună sau excepţională la pacienţii trataţi cu Bronhodin.

Iată, de exemplu, modificările valorilor SIgA (mg/100 mg proteină) în diferite momente ale tratamentului la pacienţii cu o evoluţie clinică excepţională :

H.R....11,4 (înainte de tratament), 14,3 (a II-a recoltare), 24 (a IV-a recoltare), 41 (a VII-a recoltare)

G.S. ... 11,8 (înainte de tratament), 24,3 (a II-a recoltare), 31,3 (a IV-a recoltare), 27 (a VII-a recoltare)

T.G. ... 7 (înainte de tratament), 8,2 (a II-a recoltare), 21,8 (a IV-a recoltare), 32 (a V-a recoltare)

Singurul pacient care a dat un răspuns clinic negativ, *G.M.*, a prezentat în timpul tratamentului modificări ale valorilor SIgA, care nu au reuşit totuşi să atingă intervalul de normalitate :

G.M. ... 11,3 (înainte de tratament), 15,8 (a II-a recoltare), 17,0 (a V-a recoltare)

Este deci remarcabilă fidelitatea cu care valorile SIgA produse la nivelul mucoasei respiratorii însoţesc modificările stării de sănătate a pacientului. Imunoglobulinele serice dau indicaţii mult mai puţin exacte. Astfel, un grup de cercetători (19) relatează creşteri semnificative ale IgG şi IgA serice la numai 28% din copiii trataţi cu Bronhodin şi Levamisol. Există de asemenea date privind creşterea valorilor medii ale IgG în special şi IgA seric la un grup de pacienţi cu infecţii ale căilor respiratorii trataţi cu Bronhodin (3). În acest caz se obţine un singur maxim, la 30 de zile de tratament, ceea ce corespunde cu rezultatele găsite de noi în cazul răspunsului imun local. În plus, valorile anticorpilor secretori mai prezintă încă un maxim ; spre deosebire de IgA seric, SIgA are o dinamică ondulatorie. De asemenea, rezultatele noastre arată că există şi modificări ale SIgA specifice fiecărui pacient, ceea ce nu putem corela cu datele privind variaţia IgA seric (3), unde se dau numai modificările întregului grup de pacienţi.

Comparînd rezultatele noastre cu cele obţinute prin imunostimularea cu Aerodin, un alt produs polimicrobian preparat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino" (20), observăm următoarele : valorile SIgA în secreţiile nazale cresc după administrarea de Aerodin la fel de repede ca cele din saliva umană după administrarea de Bronhodin, indicînd stimularea de către cele două produse a sintezei SIgA la nivelul mucoasei respiratorii.

Acest răspuns atinge maximum în cazul Aerodinului la numai 30 de zile de la prima administrare, în timp ce la Bronhodin la 45—60 de zile. Acest fapt s-ar putea datora atît compoziţiei diferite a celor două produse, cît şi modului diferit de administrare (aerosol la Aerodin, injecţii subcutanate la Bronhodin).

După 60 de zile, valorile SIgA scad în cazul Aerodinului, în timp ce la Bronhodin întîlnim un efect de durată mai lungă, obţinîndu-se un al doilea maxim la a VII-a recoltare, adică după 4 luni.

Dinamica modificărilor SIgA în saliva pacienţilor trataţi cu Bronhodin indică aşadar o stimulare rapidă, ondulatorie şi de durată a imunităţii locale la nivelul mucoasei respiratorii.

SC liberă în saliva pacienţilor trataţi cu Bronhodin

Se ştie că piesa secretoare (SC) se găseşte fie liberă (FSC), fie legată de imunoglobulina A dimer (BSC), formînd SIgA. La naştere, piesa secretoare se găseşte exclusiv în stare liberă (21). Locul de formare a celor două componente pare a fi diferit, şi anume dimerul IgA din molecula SIgA este sintetizat de aparatul limfatic al submucoaselor, de plasmocitele de la acest nivel, în timp ce piesa secretoare este sintetizată de celulele din epiteliul mucoaselor (22).

Cunoaşterea modificărilor SC paralel cu ale SIgA în timpul tratamentului cu Bronhodin ar putea contribui la cunoaşterea mecanismului intim de acţiune al acestui agent.

Folosirea dublei difuzii radiale faţă de serurile anti-IgA seric şi anti-SC simultan cu anti-SIgA a constituit totodată un mijloc de verificare a rezultatelor. Aceasta se referă la faptul că serul anti-SIgA, pe care l-am folosit la determinarea cantitativă a SIgA, dînd linie de precipitare atît cu SC cît şi cu IgA seric, ar fi putut exprima una din aceste două componente. Urmărind formarea liniilor de precipitare simultan cu cele trei antiseruri, putem spune dacă este vorba de SIgA sau de IgA seric provenit din salivă prin extravazare, ca şi albumina serică (23).

Astfel, în figurile 2, 3 şi 4 se observă că unele probe dau cu serul anti-SC două linii de precipitare : una datorată BSC, care prezintă identitate totală cu linia de precipitare faţă se serul anti-SIgA, şi a doua, avînd o viteză de difuzie mai mare, datorată FSC. Coroborînd aceste rezultate cu valorile SIgA obţinute prin imunodifuzia radială în anti-SIgA, am găsit că :

— apariţia piesei secretoare libere (FSC) însoţeşte numai în foarte puţine cazuri valori mici ale SIgA, şi anume la proba 14 = 11,9 mg SIgA/100 mg proteine şi la proba 43 = 11,8 mg SIgA/100 mg proteine (fig. 2). Ambele probe au fost recoltate înainte de tratament. Brandtzaeg (24) şi Strober şi colab. (25) au relatat prezenţa FSC la pacienţii deficienţi în SIgA, ceea ce în lucrarea de faţă se confirmă, după cum am văzut, într-o mică măsură ;

— FSC apare însă frecvent în saliva recoltată în cursul tratamentului, odată cu creşterea valorilor SIgA, ca urmare a imunostimulării de către Bronhodin : probele 56, 65 (fig. 3) şi 111, 129, 131 (fig. 4). Acest fapt ar pleda pentru rolul pe care SC l-ar putea avea, printre altele, de a semnala localizarea celulelor producătoare de IgA, de a stimula diferenţierea sau proliferarea acestora în mucoase.

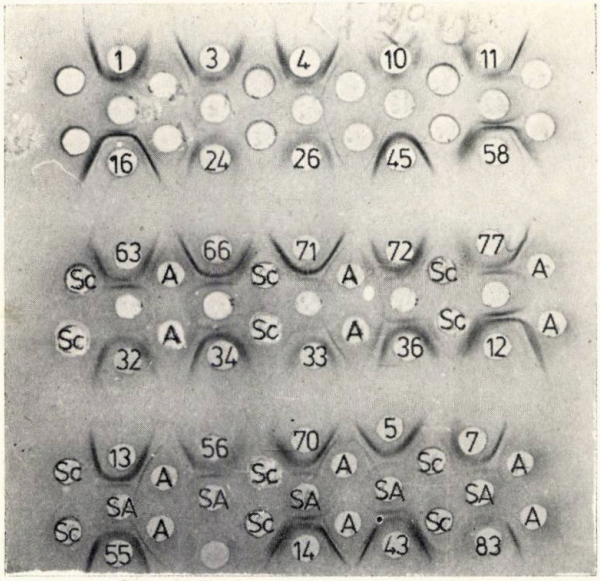
Lactoferina în saliva pacienţilor trataţi cu Bronhodin

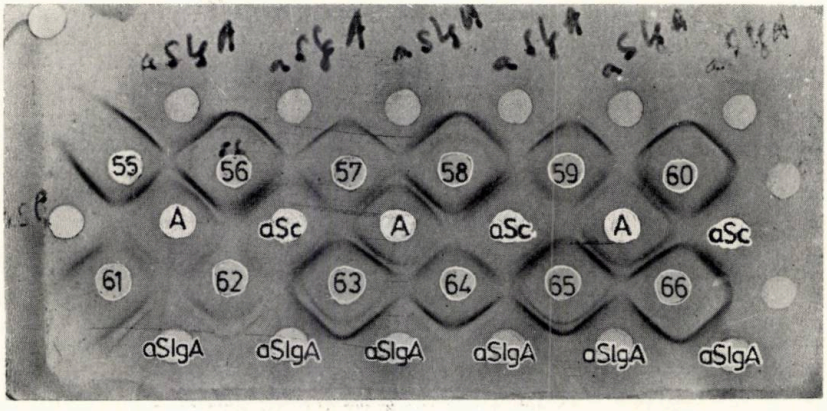
Lactoferina, prezentă în majoritatea secreţiilor ce scaldă mucoasele, este unul din factorii de apărare locală neimunologică pe care organismul îi pune în funcţie înainte de a recurge la mijloacele imunologice specifice şi nespecifice.

Rolul lactoferinei în apărarea faţă de infecţiile locale se explică prin acţiunea sa bacteriostatică (26), (27), realizată prin chelarea cu uşurinţă a fierului, element esenţial unor varietăţi de specii microbiene. Lucrări recente (28) au evidenţiat şi o acţiune directă, bactericidă a lactoferinei asupra unor bacterii : *V. cholerae* (Gram —), *S. mutans* (Gram +), în concentraţii reprezentînd limitele fiziologice pentru multe secreţii. Scăderea nivelului fierului în procesele inflamatorii şi eliberarea lactoferinei fără fier la locul inflamaţiei (29) sînt argumente în favoarea participării lactoferinei la procesul de apărare locală, nespecifică la nivelul mucoaselor.

Urmărirea dinamicii modificărilor lactoferinei în cursul imunostimulării, aspect neabordat în literatură pînă în prezent, corelat cu datele asupra modificărilor anticorpilor secretori, oferă posibilitatea cunoaşterii mai aprofundate a mecanismelor de apărare locală.

Valoarea medie a lactoferinei, determinată în saliva pacienţilor cu afecţiuni respiratorii înainte de tratament, a fost de 3,5 mg/100 mg proteină, deci în limite normale. Totuşi, cu excepţia a patru probe care depă-





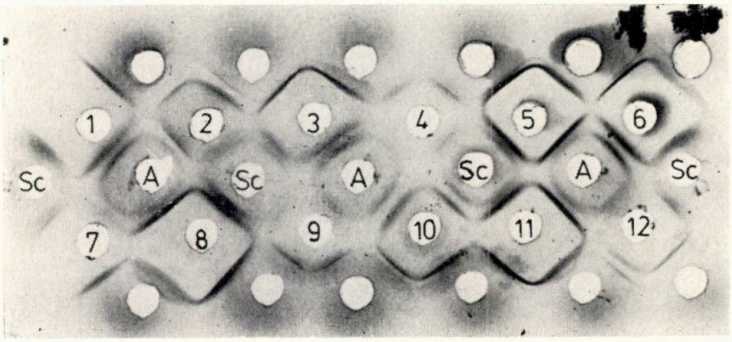


Fig. 2, 3 și 4. — Dubla difuzie radială a probelor de salivă față de serurile imune anti-SIgA, anti-SC și anti-IgA seric.

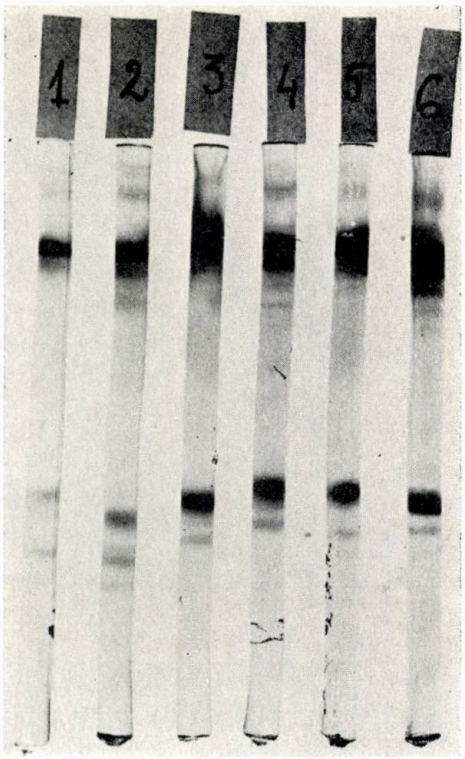


Fig. 5. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a probelor de salivă recoltate înainte (*1*) și în timpul tratamentului cu Bronhodin (*2—6*) la bolnavul *B.A.C.* (colorare pentru proteine).

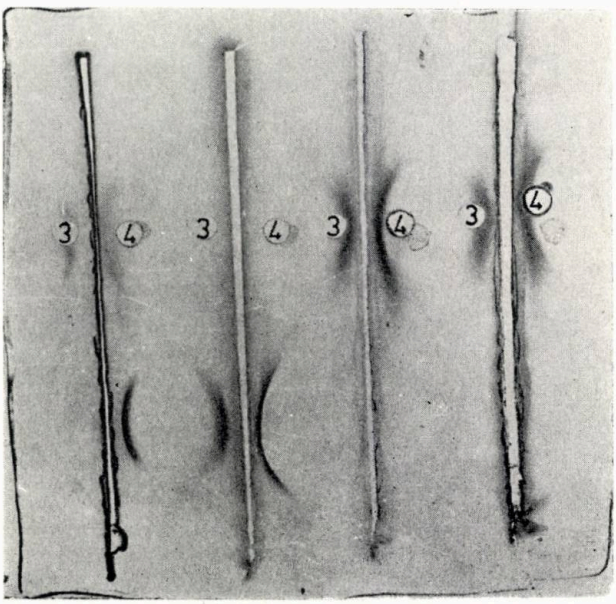


Fig. 6. — Imunoelectroforeza salivei înainte și după tratamentul cu Bronhodin față de antiserurile (de la stînga la dreapta) antiser sanguin total, antialbumină serică umană, anticolostru anti-SIgA la pacientul *B.A.* : 3 = I recoltare ; 4 = a VI-a recoltare.

şesc această valoare (*I.M.* = 12, *B.C.* = 7,5, *D.A.P.* = 6,48, *M.A.* = = 31 mg lactoferină/100 mg proteină), toate celelalte valori au fost mici, uneori nedecelabile cu metodele obişnuite de laborator. De remarcat sînt rezultatele relatate de curînd (30), care atestă creşterea semnificativă a nivelului lactoferinei în spută numai în cazul bolnavilor bronşitici cu boală recentă, celelalte categorii de bronşitici şi bolnavii cu emfizem avînd concentraţii de lactoferină practic egale. Dacă vechimea afecţiunii este într-adevăr un factor care influenţează concentraţia lactoferinei în salivă, acest fapt concordă cu datele noastre clinice, întrucît bolnavii studiaţi au o vechime a bolii mai mare de un an.

Faptul că valorile foarte mici, nedecelabile de lactoferină au însoţit valori foarte mici de SIgA sugerează că deficienţa în SIgA ar putea fi însoţită şi de o sinteză insuficientă de lactoferină.

Determinarea lactoferinei în timpul tratamentului la grupul de pacienţi studiat a condus la obţinerea următoarelor valori medii :

I recoltare (înainte de tratament) ...3,54 mg lactoferină/100 mg proteină
a II-a recoltare (la 2 săptămîni)... 4,96 mg lactoferină/100 mg proteină
a III-a recoltare (la 4 săptămîni) ... 5,72 mg lactoferină/100 mg proteină
a IV-a recoltare (la 6 săptămîni) ... 14,03 mg lactoferină/100 mg proteină
a V-a recoltare (la 2 luni) ... 15,31 mg lactoferină/ 100 mg proteină
a VI-a recoltare (la 3 luni) ... 7,61 mg lactoferină / 100 mg proteină
a VII-a recoltare (la 4 luni) ... 66,82 mg lactoferină / 100 mg proteină
a VIII-a recoltare (la 5 luni ... 95,54 mg lactoferină / 100 mg proteină
a IX-a recoltare (la 6 luni) ... 138 mg lactoferină / 100 mg proteină

Observăm o creştere semnificativă a valorilor lactoferinei în timpul tratamentului cu Bronhodin. Excepţie face recoltarea de la 3 luni, cînd se obţine o scădere, după care valorile cresc din nou. Totuşi, nu la toţi pacienţii se înregistrează această scădere, ceea ce demonstrează existenţa unor variaţii individuale. Explicaţia acestei creşteri nu o cunoaştem, dar putem presupune că lactoferina, produs al secreţiei epiteliului bronşic, creşte sub efectul unui stimul adecvat, care poate fi atît infecţia virală sau bacteriană, cît şi vaccinarea cu Bronhodin.

Urmărind reprezentarea grafică a dinamicii lactoferinei simultan cu cea a SIgA la un grup de bolnavi (fig.1, e—h) în timpul tratamentului, se observă existenţa unui paralelism între cele două curbe, modificările lactoferinei avînd de asemenea un mers ondulatoriu, ca şi cele ale SIgA. Totuşi, în cazul lactoferinei, nivelul creşte, fiind mult mai mare decît cel iniţial, în timp ce la SIgA nivelul final este superior celui iniţial, dar nu într-o măsură atît de mare.

Aceste rezultate indică mecanisme diferite de stimulare a sintezei celor două componente ale unor sisteme de apărare locală diferite. În orice caz, contribuţia lactoferinei la apărarea neimunologică a mucoaselor este evidentă. Sînt de asemenea revelatoare interacţiunea celor două sisteme de apărare, imunologic secretor şi neimunologic, şi stimularea lor simultană în tratamentul cu Bronhodin.

Alte proteine în saliva pacienţilor cu infecţii repetate trataţi cu Bronhodin

Saliva conţine atît proteine provenite din ser, cît şi proteine proprii, sintetizate la nivel local. Concentraţia lor este mult mai mică decît în ser, dar cu ajutorul unor metode moderne, ca lasernefelometria, s-au

putut evalua şi componenţi mai dificil de determinat, cum este lizozimul (31), care, datorită complexelor pe care le formează uşor cu mucinele şi polizaharidele abundente în salivă, poate fi inactivat.

Fracţiunile proteice obţinute prin electroforeza salivei în gel de poliacrilamidă sînt ilustrate în figura 5. Cele şase discuri reprezentînd saliva recoltată înainte şi în timpul tratamentului de la acelaşi pacient arată modificările produse fie în intensitatea benzilor proteice, fie în apariţia unor benzi noi. Aceste modificări se întîlnesc atît în zona catodică, proprie SIgA şi lactoferinei, în cea a amilazei şi a β_2-globulinelor, cît şi în zona anodică, unde este situată albumina.

Imunoelectroforeza salivei faţă de serurile antiser sanguin total, antialbumină serică umană, anticolostru uman şi anti-SIgA (fig. 6) relevă, de asemenea, modificări după 3 luni de tratament (fig. 6, *4*) faţă de aspectul iniţial (fig. 6,*3*).

După cum se vede, arcul de precipitare corespunzător albuminei, slab ca intensitate înainte de tratament, se intensifică după tratamentul cu Bronhodin. La fel se comportă şi arcul de precipitare corespunzător SIgA în cazul serului anticolostru şi anti-SIgA.

Vedem deci că stimularea sistemului imun specific de apărare locală este însoţită de o serie de modificări ale altor componente nespecifice sau neimunologice, modificări al căror mers poate fi sau nu paralel cu al celor studiate de noi la SIgA şi lactoferină. Lucrări viitoare vor aduce date pentru lămurirea acestor aspecte încă neelucidate.

CONCLUZII

Determinarea valorilor SIgA în saliva pacienţilor cu infecţii repetate la nivelul căilor respiratorii şi urmărirea dinamicii apariţiei şi a modificărilor acestor anticorpi în cursul tratamentului cu Bronhodin se dovedesc a fi un mod deosebit de specific şi fidel de cunoaştere a eficacităţii tratamentului şi a duratei sale optime de acţiune. Rezultatele noastre au arătat :

1. Prezenţa, înainte de tratament, a unor valori scăzute de SIgA, în medie de 10,93 mg/100 mg proteină, confirmînd datele privind frecvenţa infecţiilor la pacienţii cu deficienţă în SIgA ; la 20% din cazuri, valorile SIgA sînt în limite normale, fapt explicat de unii autori (25) prin aceea că deficienţa acestei imunoglobuline duce la îmbolnăviri numai atunci cînd este însoţită şi de altă anomalie imunologică.

2. Dinamica apariţiei şi a persistenţei anticorpilor secretori în timpul tratamentului cu Bronhodin are un mers ondulatoriu ; valorile SIgA încep să crească rapid la numai două săptămîni de la începerea tratamentului, atingînd maximum la 45—60 de zile ; un al doilea maxim se înregistrează la 4 luni, după care valorile scad, rămînînd superioare celor iniţiale. Aceste date sugerează perioada de 4 luni ca fiind suficientă pentru desfăşurarea unei etape de tratament.

3. Rezultatele clinice au fost într-o foarte bună concordanţă cu datele noastre, creşterea valorilor SIgA în salivă mergînd paralel cu îmbunătăţirea stării de sănătate a bolnavului.

4. Datele noastre indică o stimulare a sintezei SIgA la nivelul mucoasei respiratorii indusă de vaccinarea cu Bronhodin, efect ce se desfăşoară mai lent şi pe durată mai lungă decît în cazul administrării Aerodinului.

5. Prezenţa piesei secretoare libere însoţeşte valorile crescute de SIgA, ca urmare a imunostimulării produse de administrarea Bronhodinului, sugerînd rolul de semnal al acesteia în sinteza moleculelor de SIgA.

6. Studiul modificărilor lactoferinei aduce date importante asupra participării componentelor nespecifice ale sistemului de apărare. Astfel, la pacienţii cu afecţiuni respiratorii ce prezintă valori foarte mici de SIgA în salivă, lactoferina este în cantităţi nedecelabile prin mijloacele de laborator obişnuite, deficienţa sintezei SIgA putînd fi însoţită de o deficienţă în sinteza lactoferinei.

7. Dinamica valorilor lactoferinei în cursul tratamentului cu Bronhodin merge paralel cu cea a SIgA, prezentînd maximum între 45 şi 60 de zile; totuşi, în ultima parte a intervalului (a 4-a, a 5-a şi a 6-a lună), valorile medii ale lactoferinei continuă să crească, în timp ce ale SIgA descresc.

8. Vaccinarea cu Bronhodin are aşadar un efect stimulator atît asupra sintezei SIgA la nivelul mucoasei respiratorii, cît şi asupra sistemului local de apărare nespecifică. Efectul este complex, reflectîndu-se şi în modificări ale unor componente proprii ale salivei provenite din ser, aşa cum reiese din determinările de imunoelectroforeză şi disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă.

Prezentat la redacţie
la 14 decembrie 1979

Institutul de ştiinţe biologice
Bucureşti, Splaiul Independenţei nr. 296

SIgA AND LACTOFERRIN SYNTHESIS IN SALIVA OF PATIENTS WITH RESPIRATORY DISEASES TREATED WITH BRONHODIN

SUMMARY

SIgA and lactoferrin values in saliva of the patients with respiratory diseases were determined before and during the Bronhodin treatment.

The results reveal both SIgA and lactoferrin deficiency. Bronhodin treatment results in an increase of both parameters, showing an undulatory curve.

The highest values were recorded after 45—60 days from the onset of the treatment.

These data are in good agreement with the clinical results.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Seropian, în *Prevenirea infecţiilor căilor respiratorii prin influenţarea răspunsului imun cu produse microbiene*, Simpozion, Piatra Neamţ, mai 1978, p. 57.
2. E. Seropian, V. Filip, Jana Rodica Radu, în *Prevenirea infecţiilor căilor respiratorii prin influenţarea răspunsului imun cu produse microbiene*, Simpozion, Piatra Neamt, mai 1978, p. 89.

3. C. Popescu, I. Pencea, Silvia Hoisie, Şt. Iancu, M. Simichi, Rodica Radu, E. Seropian, E. Grigoraş, D. Anton, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **37**, 331 (1978).
4. J. Boussuet, F. B. Michel, Rev. franç. Mal. resp., **6**, 629 (1978).
5. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. W. Krauss, J. Immunol., **108**, 738 (1972).
6. B. Johansson, Acta chem. scand., **23**, 683 (1959).
7. R. Newcomb, D. Normansell, B. M. Stanworth, J. Immunol., **101**, 905 (1968).
8. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
9. M. Bradford, Annal. Biochem., **72**, 248 (1976).
10. C. Mancini, A. Carbonara, J. F. Heremans, Immunochemistry, **2**, 235 (1965).
11. J. L. Fahey, E. M. McKelvey, J. Immunol., **94**, 84 (1965).
12. O. Ouchterlony, Acta path. microbiol. scand., **26**, 516 (1949).
13. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 404 (1964).
14. M. A. Mandel, M. D. Kenneth, J. Dvorak, L. W. Worman, J. J. Delosse, New Engl. J. Med., **295**, 694 (1976).
15. J. P. Mach, J. J. Pahud, J. Immunol., **106**, 252 (1971).
16. J. P. Girard, Med. Hyg., **106**, 572 (1972).
17. G. Virella, J. Goudswaard, Clin. Chem., **24**, 1421 (1978).
18. P. A. Ostergaard, Danish med. Bull., **26**, 294 (1979).
19. I. Tanşanu, M. Burdea, A. Brăteanu, T. Mănăilă, E. Cristogel, în *Prevenirea infecţiilor căilor respiratorii prin influenţarea răspunsului imun cu produse microbiene*, Simpozion, Piatra Neamţ, mai 1978, p. 101.
20. C. Popescu, S. Hoisie, I. Pencea, D. Anton, C. Pintilie, R. Bărbuţă, O. Căzănaru, S. Apostol, Arch. roum. Path. exp. Microbiol., **37**, 323 (1978).
21. P. Brandtzaeg, J. Fjellanger, St. Gjerulalsen, Scand. Haemat., Suppl., **12**, 83 (1970).
22. D. R. Tourville, R. H. Adler, J. Bienenstock et al., J. exp. Med., **129**, 411 (1969).
23. I. D. Mandel, H. S. Khurana, Arch. oral Biol., **14**, 1433 (1969).
24. P. Brandtzaeg, Nature (Lond.), **220**, 292 (1968).
25. W. Strober, R. Krakauer, H. L. Klaeveman, N. Y. Reynolds, D. L. Nelson, New Engl. J. Med., **294**, 351 (1976).
26. B. Reiter, J. H. Brock, E. D. Steel, Immunology, **28**, 83 (1975).
27. E. D. Weinberg, Science, **184**, 952 (1974).
28. R. R. Arnold, M. F. Cole, J. R. McGhee, Science, **197**, 963 (1977).
29. A. L. Van Suick, P. L. Masson, J. F. Heremans, Biochim. biophys. Acta, **322**, 231 (1973).
30. M. Marin, C. Abrudan, A VIII-a Reun. Naţ. Imunol., Cluj-Napoca, 18—19 mai 1979.
31. J. Goudsward, G. Virella, Clin. Chem., **23**, 967 (1977).

ACTIVITATEA β-ASPARTATKINAZEI ŞI A CATALAZEI LA *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* CULTIVAT ÎN CONDIŢII NEFAVORABILE DE AGITARE ŞI MEDIU

MAGDALENA LUNGU*, MONA VOCIU**, ELENA SĂSĂRMAN**, CONSTANŢA MUŞOLAN* CORINA IORDACHE*

Rezumat. Celulele de *Corynebacterium melassecola* s-au cultivat în condiţii de agitare şi în condiţii statice, în condiţii de mediu nefavorabile (extract de porumb de calitate slabă şi în concentraţii neoptime). Efectele s-au urmărit atît în fază de inocul cît şi în fermentaţie şi au fost corelate cu producţia finală de lizină. Condiţiile de neaerare au afectat evident atît catalaza cît şi β-aspartatkinaza, în timp ce condiţiile nefavorabile de mediu au avut efecte îndeosebi asupra β-aspartatkinazei. Nivelul activităţii acestor enzime a apărut direct corelat cu sinteza finală de lizină. În toate cazurile, efectele induse de condiţiile nefavorabile au fost reversibile, astfel că enzimele au revenit la nivelele normale de activitate după un anumit interval de la încetarea acţiunii acestor condiţii.

Tulpina *Corynebacterium* prezintă o particularitate biochimică cu consecinţe practice importante prin faptul că, în anumite condiţii, metabolismul său poate fi dirijat în sensul biosintezei preferenţiale a lizinei şi al acumulării acesteia în mediul de cultură. Factorul cheie în acest proces este β-aspartatkinaza, enzimă care catalizează formarea β-aspartilfosfatului, intermediar utilizat în biosinteza lizinei şi a aminoacizilor din familia homoserinei (treonină, metionină). Proprietatea caracteristică a β-aspartatkinazei este de a fi inhibată prin acţiunea simultană a lizinei şi a treoninei, dar nu şi de fiecare din cei doi aminoacizi în parte. Pe această proprietate se bazează producerea lizinei de către mutanţii auxotrofi de *Corynebacterium*, dependenţi de homoserină. În aceşti mutanţi, incapabili să sintetizeze homoserina, deci şi treonina, β-aspartatkinaza nu va mai fi inhibată, furnizînd continuu intermediari pentru sinteza lizinei.

Biosinteza lizinei de către microorganismul menţionat depinde şi de activitatea enzimelor din ciclul acizilor tricarboxilici (ATC), furnizorul acidului oxalacetic, care prin transaminare şi fosforilare trece în β-aspartilfosfat, precursor al lizinei (1), (2).

Ţinînd seama de aceste interrelaţii metabolice, rezultă clar că acumularea lizinei depinde de factori care controlează direct calea de biosinteză a acestui aminoacid, precum şi de factori care interferă cu ciclul ATC. De asemenea, date fiind interconexiunile metabolice intracelulare, producerea lizinei este afectată de agenţi ce influenţează metabolismul general al bacteriei.

Se ştie că producerea lizinei depinde foarte mult de calitatea mediului de cultură, de condiţiile de aerare şi agitare. Este cunoscut de asemenea că efectele acestor condiţii sînt diferite, în funcţie de etapa de dezvoltare a culturii.

În această lucrare am urmărit activitatea β-aspartatkinazei şi a catalazei în celulele de *Corynebacterium melassecola*, culti vate în condiţii statice şi de agitare, pe medii necorespunzătoare calitativ. Observaţiile s-au făcut atît pe culturi în faza de inocul cît şi în faza de fermentaţie, raportînd rezultatele la randamentul final de producere a lizinei de către aceste culturi.

MATERIAL ŞI METODE

Pregătirea probelor. S-a lucrat cu celule de *Corynebacterium melassecola* în fază de inocul şi de fermentaţie, recoltate la anumite perioade de timp. Suspensiile respective s-au centrifugat la 15 000 rot/min, 20 min, la 4°C, după care supernatantul (lichidul de structură) s-a separat de reziduu (celule). Celulele au fost îngheţate-dezgheţate cu azot lichid şi mojarate (operaţia de îngheţare-dezgheţare s-a repetat de 5 ori pentru fiecare probă). Mojaratul s-a reluat în apă distilată (1 : 2,5—1 : 4) (v/v), respectiv Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, s-a extras 24 de ore şi s-a centrifugat la 15 000 rot/20 min la 4°C, iar supernatantul obţinut a fost folosit ca omogenat celular în dozările ulterioare.

Activitatea catalazică s-a determinat prin difuzie radială în gel de agar. 10 µl extract enzimatic au difuzat în gel de agar (1% în apă distilată), timp de 18 ore la 30°C, în camera umedă. Apoi, gelurile au fost prelucrate după două tehnici diferite :

a) Gelul s-a imersat într-un amestec proaspăt preparat de tiosulfat de sodiu 0,06 M şi H_2O_2 3% (30 : 70) (v/v), timp de 30—60 s, după care s-a trecut în iodură de potasiu 0,09 M. Zonele de activitate catalazică au apărut ca arii incolore pe un fond albastru-negru ; culoarea este instabilă şi difuză, drept care plăcile s-au fotografiat imediat (3).

b) Gelul s-a imersat în H_2O_2 0,003%, s-a spălat cu apă distilată, după care s-a imersat într-un amestec proaspăt preparat de fericianură de potasiu 1% şi clorură ferică 1%, timp de 10 min. Apoi s-a spălat cu apă distilată şi s-a păstrat la întuneric pînă în momentul fotografierii. Zonele cu activitate catalazică au apărut galbene pe un fond verde închis, coloraţia fiind stabilă în timp (4).

Activitatea β-aspartatkinazei a fost determinată în omogenatele celulare pregătite în Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Amestecul de reacţie conţinea în 1 ml : ATP 20 mM, acid aspartic 100 mM, $MgCl_2$ 20 mM, hidroxilamină 400 mM, omogenat celular, pH 8,0 (corectat înainte de amestecare cu NaOH 3,5 N şi Tris-bază) (5).

Probele martor conţineau toţi reactivii, cu excepţia acidului aspartic, iar omogenatul celular a fost în prealabil încălzit la 100°C timp de 5 min şi răcit la temperatura camerei. După 30 min la 37°C, reacţia a fost stopată cu 1,5 ml $FeCl_3$ 10%—TCA 3,3%— HCl 0,7 N (5). Prin adăugarea acestui reactiv precipită complexul format între fier şi acidul aspartohidroxamic. După centrifugare, în supernatant se determină densitatea optică la 540 nm. Activitatea enzimatică a fost determinată raportînd diferenţele activităţilor optice la 540 nm dintre probă şi martor la densitatea optică de la 280 nm. Rezultatul obţinut se raportează apoi la 1 ml, iar în final se înmulţeşte cu 1 000 (6).

REZULTATE

Efectele cultivării în condiţii de neagitare

Efectele cultivării în condiţii de neagitare s-au urmărit în mai multe scheme de lucru, dintre care prezentăm un exemplu.

Inoculele de *Corynebacterium melassecola* s-au cultivat în laborator, în condiţii standard de agitare-aerare şi în flacoane neagitate. După 12, 24, 48 şi 72 de ore de cultivare a inoculelor, acestea au fost transferate în mediul de fermentaţie, din care s-au recoltat alicote la 24, 48 şi 72 de ore (schema 1).

Schema 1

Efectul condiţiilor de neaerare asupra inoculului (schema de lucru)

Vîrsta inocul/ fermentaţie	Inocul static				Inocul agitat			
	inocul probă	fermentaţie probă la :			inocul probă	fermentaţie probă la :		
		24 ore	48 ore	72 ore		24 ore	48 ore	72 ore
12 ore	10*	18	26	34	7	17	25	33
24 ore	12	20	28	36	11	19	27	35
48 ore	14	22	30	38	13	21	29	37
72 ore	10	24	32	40	15	23	31	39

* Cifrele din schemă indică numărul curent al probei.

Activitatea catalazei este evident mai mică în inoculele statice faţă de cele agitate. De remarcat însă că fermentaţiile realizate cu inocule statice prezintă activităţi catalazice foarte asemănătoare cu cele realizate cu inocule agitate, indiferent de vîrsta inoculului folosit în fermentaţii şi de vîrsta culturii în fermentaţie (fig. 1).

Activitatea β-aspartatkinazei prezintă diferenţe foarte mari în omogenatele de inocule statice faţă de cele agitate. În primele 48 de ore de cultivare, activitatea aspartatkinazei în inoculele agitate este de circa 5 ori mai mare decît în cele statice ; la 72 de ore, inoculele agitate prezintă o activitate enzimatică foarte scăzută, chiar mai scăzută decît cea a inoculelor statice. Omogenatele probelor din fermentaţii au activităţi în general scăzute atît în cazul în care s-a folosit inocul agitat, cît şi atunci cînd s-a folosit inocul static. În ciuda diferenţelor de activitate aspartatkinazică constatate între inoculele agitate şi cele statice, producţia finală de lizină în fermentaţiile realizate cu inocule statice este foarte asemănătoare cu cea obţinută cu inocule agitate. Notăm o singură excepţie, şi anume fermentaţiile realizate cu inocul static de 12 ore au un randament de numai 24 g/l faţă de cele realizate cu inocul agitat de 12 ore, care au un randament de 31,5 g/l. Trebuie remarcat că tot în acest caz fermentaţiile de 24 şi 48 de ore realizate cu inocul agitat au cele mai mari activităţi aspartatkinazice (tabela 1).

Tabela 1

Activitatea β-aspartatkinazei în omogenate de *Corynebacterium melassecola* din inocule agitate şi statice şi fermentaţiile corespunzătoare în condiţii de neaerare

	Ore	Inocul agitat				Inocul static			
		12	24	48	72	12	24	48	72
		13,30	22,60	21,20	0,24	3,30	4,50	3,90	3,60
Fermentaţii	24	7,60	1,70	2,60	5,30	2,21	1,30	3,90	4,80
	48	4,40	0,75	2,30	4,80	1,70	2,60	8,30	2,40
	72	2,40	0,88	1,90	3,40	1,80	2,30	0,25	1,20
Lizină g/l		31,5	30,0	33,0	34,3	24,0	33,4	36,0	37,9

Notă. Activitatea enzimatică se exprimă în $\frac{\Delta DO_{540}}{DO_{280}}/ml \times 10^3$

Inocul	Agitat				Static			
	12 ore	24 ore	48 ore	72 ore	12 ore	24 ore	48 ore	72 ore
	×	×	×	×	×	×	×	×
Ferm. 24 ore	×	×	×	×	×	×	×	×
48 ore	×	×	×	×	×	×	×	×
72 ore	×	×	×	×	×	×	×	×

Fig.1. — Activitatea catalazei în omogenate de inocul agitat şi, respectiv, static şi fermentaţiile corespunzătoare (schema de lucru 1).

Fig.2. — Activitatea catalazei în inoculele şi fermentaţiile realizate în medii cu extract de porumb (EP) de calitate slabă, în concentraţii variabile (schema de lucru 2). Probele au fost puse pe placă astfel :

× I_0	× $I_{0,5}$	× I_1	× I_2	× I_3	× I_5	× I_0F_3 24 ore	× $I_{0,5}F_3$ 24 ore
× I_0F_0	× $I_{0,5}F_0$	× I_1F_0	× I_2F_0	× I_3F_0	× I_5F_0	× I_0F_3 48 ore	× $I_{0,5}F_3$ 48 ore
× I_0F_0 24 ore	× $I_{0,5}F_{0,5}$ 24 ore	× I_1F_1 24 ore	× I_2F_2 24 ore	× I_3F_3 24 ore	× I_5F_5 24 ore	× I_1F_3 24 ore	× I_2F_3 24 ore
× I_0F_0 48 ore	× $I_{0,5}F_{0,5}$ 48 ore	× I_1F_1 48 ore	× I_2F_2 48 ore	× I_3F_3 48 ore	× I_5F_5 48 ore	× I_1F_3 48 ore	× I_2F_3 48 ore
			× I_5F_3 24 ore	× I_5F_3 48 ore			

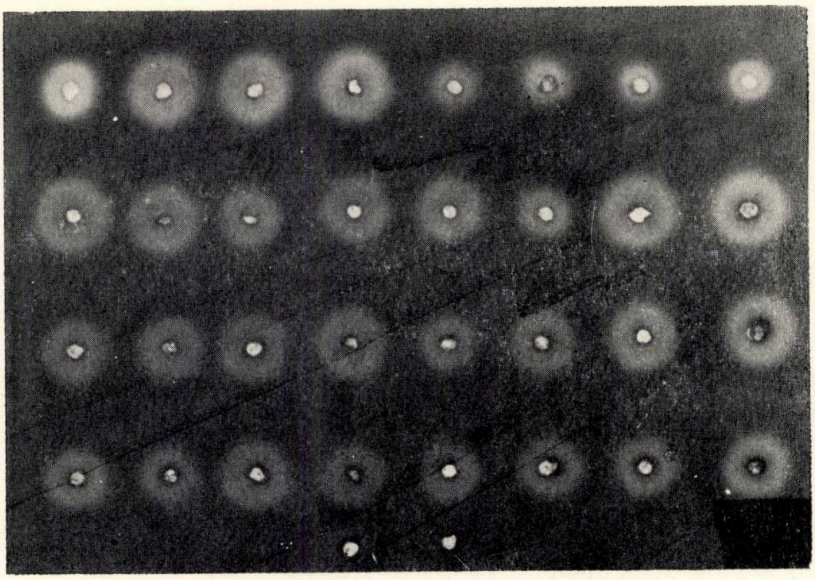


Fig. 1

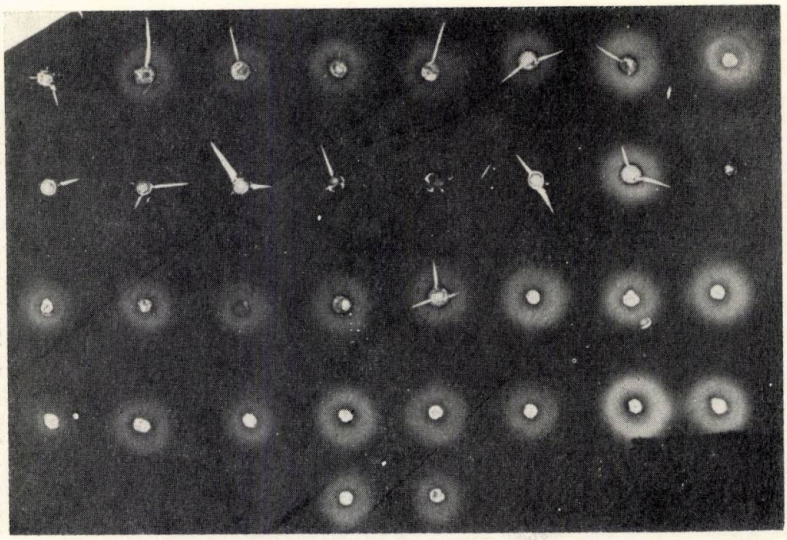
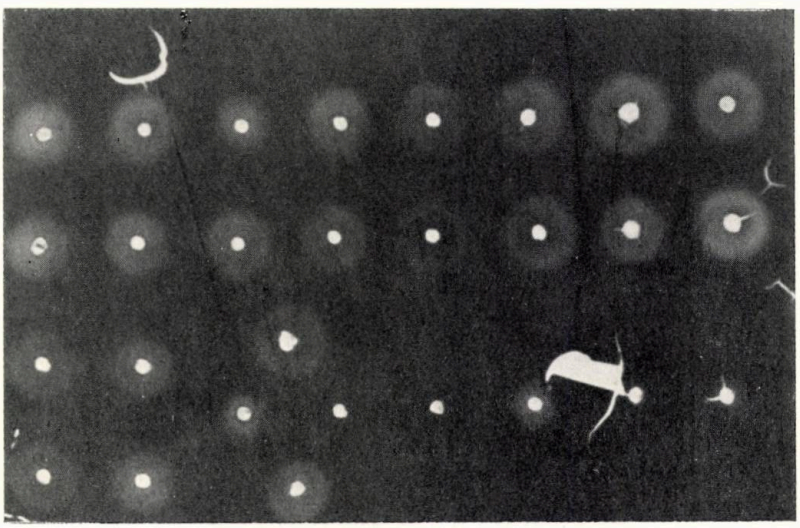


Fig. 2

Fig. 3. — Activitatea catalazei în inocule și fermentațiile realizate în medii cu extract de porumb în concentrații variabile (schema de lucru 2) și de bună calitate. Probele au fost puse astfel :

× I_0F_0 24 ore	× $I_{0,5}F_{0,5}$ 24 ore	× I_1F_1 24 ore	× I_2F_2 24 ore	× I_3F_3 24 ore	× I_5F_5 24 ore	× I_0F_3 24 ore	× $I_{0,5}F_3$ 24 ore
× I_0F_0 48 ore	× $I_{0,5}F_{0,5}$ 48 ore	× I_1F_1 48 ore	× I_2F_3 48 ore	× I_3F_3 48 ore	× I_5F_5 48 ore	× I_0F_3 48 ore	× $I_{0,5}F_3$ 48 ore
× I_1F_3 24 ore	× I_2F_3 24 ore	× I_5F_5 24 ore					
		× I_0F_0	× $I_{0,5}F_0$	× I_1F_0	× I_2F_0	× I_3F_0	× I_5F_0
× I_1F_3 48 ore	× I_2F_3 48 ore	× I_5F_5					



Efectele cultivării în condiții nefavorabile de mediu

Experiențele s-au efectuat după următoarea schemă : inoculele au fost cultivate în mediul standard preparat inițial fără extract de porumb, la care s-a adăugat extract de porumb în concentrații variabile : 0, 5, 1, 2, 3 și 5%. După 12 ore, inoculele s-au transferat în mediile standard de fermentație, în care extractul de porumb era în aceeași concentrație ca și în inoculul respectiv. După 24 și, respectiv, 48 de ore, din fermentație s-au recoltat probe pentru analize. Paralel, inoculele cultivate în medii cu diferite concentrații de extract de porumb s-au transferat în mediul de fermentație standard care conținea 3% extract de porumb, precum și în mediul de fermentație standard preparat fără extract de porumb (schema 2).

Schema 2

Urmărirea efectului concentrațiilor variabile de extract de porumb (EP) asupra inoculului și fermentației de *Corynebacterium melassecola*

Probă	Denumirea probei					
Inocul [1]	I_0	$I_{0,5}$	I_1	I_2	I_3	I_5
Probă fermentație [2]	I_0F_0	$I_{0,5}F_{0,5}$	I_1F_1	I_2F_2	I_3F_3	I_5F_5
Martor-fermentație [3]	I_0F_3	$I_{0,5}F_3$	I_1F_3	I_2F_3	I_3F_3	I_5F_3
Martor fermentație [4]	I_0F_0	$I_{0,5}F_0$	I_1F_0	I_2F_0	I_3F_0	I_5F_0

[1] Inoculele au fost cultivate în medii ce conțineau concentrații variabile de EP(0—5%).

[2] Inoculele au fost transferate în mediile de fermentație cu concentrații de EP egale cu cele ale inoculului corespunzător (de ex. : inoculul cultivat într-un mediu cu 2% EP s-a transferat în mediul de fermentație ce conținea tot 2 % EP). Din fermentații s-au recoltat probe la 24 și 48 de ore.

[3,4] Inoculele au fost transferate în paralel și în mediile de fermentație ce conțineau 3%EP (mediul standard) și, respectiv, 0 % EP (fără extract de porumb).

S-au realizat două experiențe în laborator, în care s-au folosit un extract de porumb de slabă calitate și, respectiv, un extract de porumb de bună calitate.

Celulele, atît din probele de inocul cît și din fermentații, s-au prelucrat în modul descris mai sus, determinîndu-se activitatea catalazei și a aspartatkinazei în omogenatele respective.

Activitatea catalazei în experiențele realizate, conform schemei de lucru 2, cu extract de porumb (EP) de calitate slabă este prezentată în figura 2. Nivelul activităților catalazice este relativ mic, judecînd după dimensiunile zonelor de difuzie, dar nu putem evidenția vreun efect specific al unei anumite concentrații de EP. Remarcăm totuși absența totală a activității catalazice în inoculele cultivate în medii fără EP (I_0), ca și în fermentațiile realizate fără EP (I_0F_0, $I_{0,5}F_0$, I_1F_0, I_2F_0, I_3F_0, I_5F_0). Notăm faptul că fermentațiile martor (în medii cu 3% EP) realizate cu inoculele I_0 din medii fără EP (probele I_0F_3 de 24 și, respectiv, 48 de ore) prezintă activitate catalazică asemănătoare cu celelalte probe, deși provin din inocule fără activitate catalazică. Pe de altă parte, cele două I_0F_0

de 24 şi, respectiv, 48 de ore au şi ele activitate catalazică, dar oarecum mai mică decît restul probelor. Aceasta sugerează că EP, prin componentele sale implicate în cultivarea bacteriilor *C. melassecola* şi în fermentaţia lizinei, nu este corelat direct cu activitatea catalazică a acestor celule; nivelele foarte mici de EP în mediul de cultură al inoculului (0,5%) sînt suficiente pentru ca activitatea catalazică în acest inocul să prezinte valori comparabile cu ale celei din inoculele cultivate în condiţii standard. Absenţa sau scăderea activităţii catalazice în unele cazuri ar putea fi corelată mai curînd cu o afectare generală a dezvoltării culturii decît cu un efect direct asupra activităţii acestor enzime. Remarcăm faptul că, în faza de fermentaţie, activitatea catalazică este şi mai puţin corelată cu concentraţia EP. Nivelul apreciabil al activităţii catalazice în fermentaţiile realizate în condiţii standard (3% EP) cu inocule cultivate în absenţa EP pledează pentru ipoteza caracterului reversibil al efectelor diferiţilor factori de stress asupra inoculelor, a posibilităţii celulelor acestora de a normaliza în timpul fermentaţiei devierile metabolice induse în primele faze de dezvoltare.

Activitatea catalazică în experienţa realizată după aceeaşi schemă, dar cu un EP de bună calitate (fig. 3), prezenta în toate probele nivele mai mari decît cele observate în experienţele cu EP de calitate slabă. Nici în acest caz însă nu sesizăm vreun efect net al concentraţiei EP asupra activităţii catalazei. Cele două experienţe sugerează, după cum am mai spus, că activitatea catalazică nu este corelată direct cu lanţurile metabolice controlate de diferitele componente ale EP, variaţiile observate, nesemnificative, datorîndu-se probabil gradului de dezvoltare şi de creştere a culturii în ansamblul ei.

Activitatea aspartatkinazică este, cu unele excepţii, considerabil mai mare în experienţa realizată cu EP de bună calitate în comparaţie cu cea din experienţa realizată cu EP de calitate slabă, ceea ce poate fi pus direct în legătură cu producţia de lizină, mult superioară în primul caz faţă de al doilea.

În condiţii optime de lucru, cînd este folosit un EP de bună calitate, activitatea aspartatkinazei la 24 de ore de fermentaţie creşte proporţional cu concentraţia EP în inocul, respectiv în fermentaţie, în paralel cu producţia de lizină, pînă la o concentraţie optimă de EP peste care activitatea aspartatkinazei şi producţia de lizină scad semnificativ. Remarcăm că această dinamică nu mai este respectată în fermentaţiile de 48 de ore, fapt ce poate fi explicat prin aceea că, după cum am arătat în experienţele privind cultivarea în condiţii de neagitare, activitatea aspartatkinazei este maximă la 24 de ore de fermentaţie, după care se plasează la valori relativ mici.

În experienţele realizate cu EP de calitate slabă, dependenţa activităţii aspartatkinazice de concentraţia EP este mult mai puţin evidentă, ca de altfel şi producţia de lizină, care oscilează în jurul unei valori de circa 12 g/l, indiferent de concentraţia EP din mediu (tabela 2 şi fig. 4, 5 şi 6).

Tabela 2

Activitatea β-aspartatkinazei în fermentații din medii cu diferite concentrații de EP, realizate cu inocule cultivate în medii cu concentrații corespunzătoare de EP

	EP de calitate slabă						EP de calitate bună					
	aspartatkinază		lizină				aspartatkinază				lizină	
	24 ore		48 ore		72 ore		24 ore		48 ore		72 ore	
	probă	martor	probă	martor	probă	martor	probă	martor	probă	martor	probă	martor
I_0F_0	0,8	6,4	0	0	12,9	6,0	2,27	0,87	3,18	6,40	12,2	37,0
$I_{0,5}F_{0,5}$	2,4	3,4	3,6	—	—	13,8	3,40	8,75	2,20	2,98	17,0	37,8
I_1F_1	5,3	5,1	4,5	10,8	10,8	16,0	6,20	5,50	3,20	3,15	22,2	36,3
I_2F_2	3,0	4,7	7,0	4,2	12,3	12,3	9,20	8,50	3,20	6,40	30,7	39,0
I_3F_3	6,7	6,7	3,1	3,1	12,5	12,5	0,0	0,0	9,90	9,90	37,1	37,1
I_5F_5	5,2	4,7	6,5	5,0	14,6	12,5	5,80	7,15	3,40	5,77	32,6	35,4

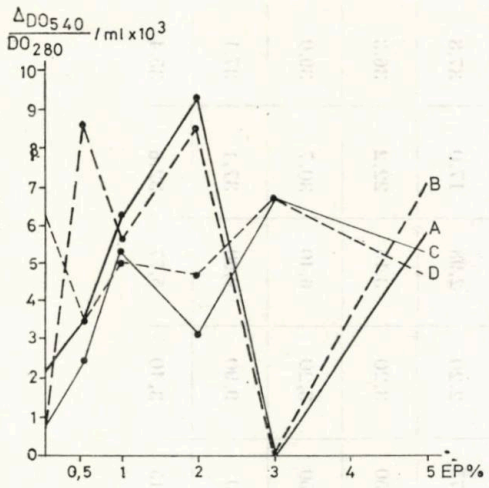


Fig. 4. — Dependenţa activităţii β-aspartatkinazei la 24 de ore de fermentaţie de concentraţia EP în mediile de inocul şi fermentaţie.

A — IF* probă
EP de bună calitate
B — IF martor
C — IF probă
EP de calitate slabă
D — IF martor

* IF = inocul-fermentaţie

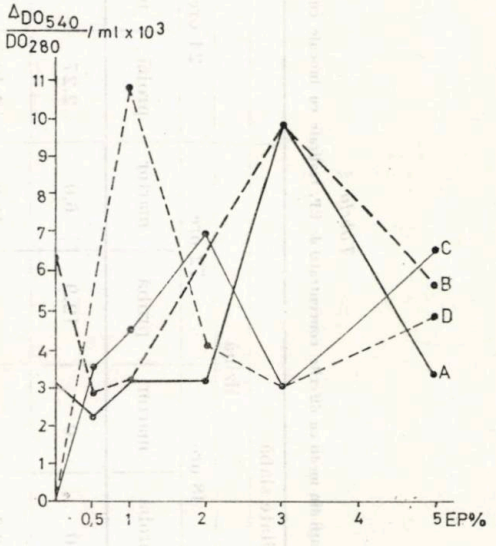


Fig. 5. — Dependenţa activităţii β-aspartatkinazei la 48 de ore de fermentaţie de concentraţia EP în mediile de inocul şi fermentaţie.

A — IF probă
EP de bună calitate
B — IF martor
C — IF probă
EP de calitate slabă
D — IF martor

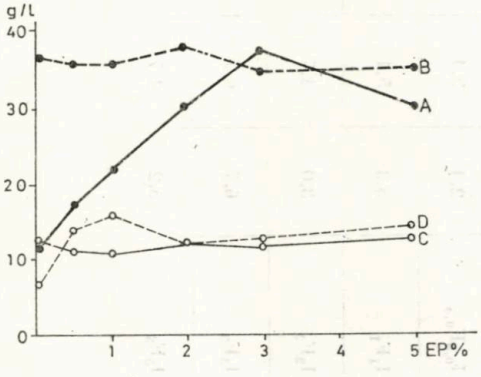


Fig. 6. — Dependenţa acumulării lizinei în mediul de cultură la 72 de ore de fermentaţie de concentraţia EP în mediile de inocul şi fermentaţie.

A — IF probă
EP de bună calitate
B — IF martor
C — IF probă
EP de calitate slabă
D — IF martor

Remarcăm faptul că variaţia concentraţiei EP are efecte directe şi asupra enzimei din inocul (tabela 3), înregistrîndu-se în general o creştere a activităţii aspartatkinazei, proporţional cu concentraţia EP de bună calitate, pînă la o valoare optimă a acestuia.

Aceste rezultate sugerează faptul că aspartatkinaza, în primele 24 de ore de fermentaţie, este direct legată de calitatea EP folosit la prepararea mediului, precum şi de concentraţia acestuia. Nivelul activităţii acestei enzime este direct legat de producţia finală de lizină din fermentaţia respectivă, ceea ce ar putea fi luat ca un criteriu precoce de apreciere a calităţii fermentaţiei după primele 24 de ore ale procesului.

Tabela 3

Activitatea β-aspartatkinazei în inoculele cultivate pe medii cu concentraţii variabile de EP

% EP	Aspartatkinază
0,5	11,4
1	12,8
2	9,7
3	13,0
5	8,8

DISCUŢII

Condiţiile nefavorabile de aerare aplicate culturii de *C. melassecola* în faza de inocul se reflectă asupra nivelului catalazei şi al aspartatkinazei: inoculele agitate prezintă activităţi enzimatice considerabil mai mari decît inoculele statice. Fenomenul este explicabil, ţinînd seama de faptul că acest microorganism este aerob, deci atît dezvoltarea sa cît şi căile metabolice de biosinteză a lizinei depind direct sau indirect de gradul de aerare a mediului (7), (8), (9). La nivel biochimic, o aerare corespunzătoare, deci o valoare optimă a presiunii parţiale a oxigenului, determină inhibiţia lactatdehidrogenazei şi prin aceasta conversia acidului piruvic în acid lactic, deci asigură un nivel ridicat al piruvatului substrat al ciclului ATC. Aerări prea puternice duc însă la inhibiţia şi a altor enzime, inclusiv a celor din ciclul ATC, deci la o scădere în biosinteza lizinei. O agitare corespunzătoare ajută difuzia metaboliţilor toxici (CO_2 etc.) din celulă în mediu (10).

Referindu-ne în mod special la catalază, am arătat că la bacteriile aerobe şi facultativ anaerobe condiţiile improprii de aerare inhibă activitatea acestei enzime (11), (12), (13).

S-a arătat că influenţa gradului de aerare depinde de etapa de dezvoltare a culturii, respectiv a fermentaţiei, influenţînd în mod diferit creşterea bacteriei faţă de procesul de producere a lizinei (14), (15). Aşadar, odată ce aerarea şi agitarea afectează direct ciclul glicolitic, reducerea piruvatului, ciclul ATC, este de aşteptat ca cel puţin pe aceste căi, dacă nu şi în mod direct, să influenţeze şi calea de biosinteză a lizinei, după cum arată şi rezultatele noastre privind β-aspartatkinaza.

Cultivarea microorganismului în condiţii nefavorabile de mediu, atît din punctul de vedere al concentraţiei extractului de porumb, cît şi al calităţii acestuia, a avut de asemenea efecte atît asupra catalazei, cît şi asupra aspartatkinazei. Efectele au fost în general mai evidente la nivelul aspartatkinazei decît al catalazei, sugerînd o corelare mai directă a enzimei din calea de biosinteză a lizinei cu etapele în care sînt implicate componentele mediului de cultură. Într-adevăr, extractul de porumb

adăugat în mediul de cultură conține compuși cu rol esențial pentru dezvoltarea microorganismului și biosinteza lizinei. Dintre aminoacizii prezenți în EP, treonina și homoserina pot inhiba biosinteza lizinei dacă se află în concentrații mai mari decît cele optime, prin inhibarea directă, sinergic cu lizina, a aspartatkinazei (1). Valina și leucina activează direct aspartatkinaza (16), precum și treonindehidraza, deci scăderea concentrației de treonină (17). Acidul glutamic stimulează biosinteza lizinei, în calitatea sa de donor de grupări amino pentru sinteza acidului aspartic (18). Dintre vitamine, se cunoaște rolul foarte important al biotinei la nivelul biosintezei lipidelor, deci al permeabilității celulare (1), precum și rolul tiaminei, coenzimă a piruvatdecarboxilazei, deci direct implicată în furnizarea acetatului activat pentru ciclul ATC. Dintre cationi, fierul și manganul peste anumite limite de concentrație deviază calea de biosinteză a lizinei către biosinteza valinei (19).

Cele de mai sus sugerează faptul că modificările induse de o concentrație necorespunzătoare de EP sau de folosirea unui EP de calitate slabă vor fi mai direct reflectate la nivelul aspartatkinazei decît al catalazei, fapt constatat experimental.

De altfel, atît efectele neagitării cît și ale condițiilor nefavorabile de mediu se pot explica în parte, referindu-ne la schema de biosinteză a lizinei (fig. 7) (2). Din această schemă rezultă clar că factorii esențiali sînt nivelul glucozei, furnizarea piruvatului ca substrat al ciclului ATC, producerea oxalacetatului, dependența de starea de funcționare a ciclului ATC, transaminarea cu formarea aspartatului. Această schemă, deosebit de utilă pentru studiul optimizării biosintezei lizinei, este incompletă și unilaterală, întrucît nu relevă interrelațiile biosintezei lizinei cu celelalte

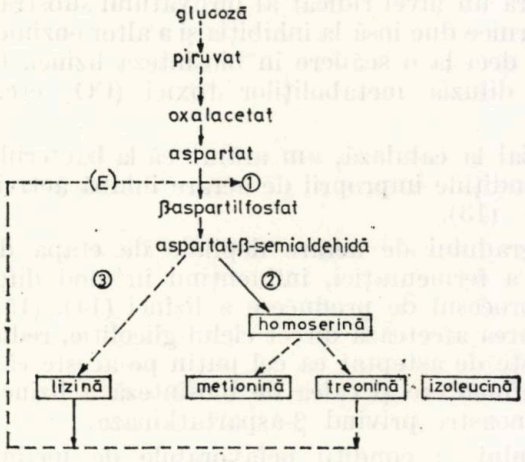


Fig. 7. — Căile metabolice de acumulare a lizinei de către mutantul auxotrof dependent de homoserină al tulpinii de *Corynebacterium melassecola*.
Liniile punctate indică inhibițiile prin produs final. În tulpinile sălbatice, aspartatkinaza este inhibată prin produs final (E) prin acțiunea sinergică a lizinei și a treoninei. În mutanții auxotrofi dependenți de homoserină, homoserindehidrogenaza (2) este blocată, astfel încît nu se mai sintetizează treonină, deci aspartatkinaza nu mai este inhibată. În acești mutanți, dehidropicolin-sintetaza (3) nu prezintă inhibiție prin produs final, ceea ce favorizează acumularea lizinei.

procese metabolice aparent izolate (fig. 8) (1). Ținînd seama de toate aceste interrelații, rezultă caracterul complex al acțiunii diferiților factori, ceea ce explică anumite efecte aparent necorelate și inexplicabile, cum ar fi scăderea activității β-aspartatkinazei în condiții de neaerare, respectiv scăderea activității catalazice în condiții nefavorabile de mediu. De asemenea, aceasta explică capacitatea celulelor de a se recupera în timp

față de efectele induse, de condițiile menționate, de a reveni la nivelele normale de activitate enzimatică la un anumit interval de timp de la încetarea condițiilor nefavorabile, așa cum am constatat pentru catalază și β-aspartatkinază.

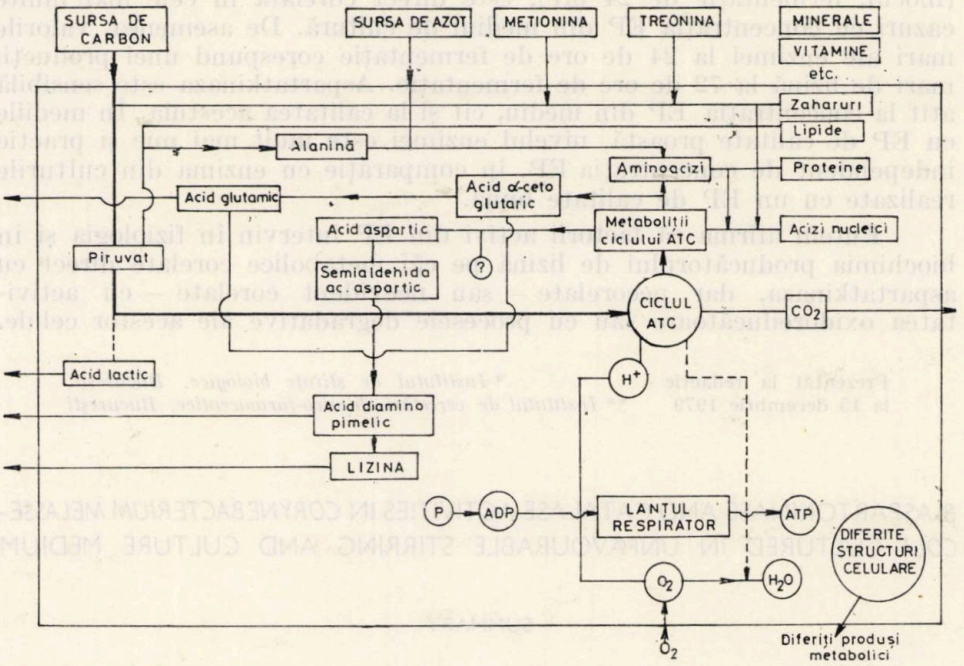


Fig. 8. — Interrelațiile metabolice ale biosintezei lizinei în auxotrofe.

CONCLUZII

1. Inoculele cultivate în condiții de agitare normale prezintă activități catalazice și aspartatkinazice considerabil mai mari decît inoculele cultivate static.

2. Fermentațiile realizate cu inocul agitat, respectiv static, prezintă activități catalazice apreciabile, indiferent de tipul de inocul folosit.

3. Aspartatkinaza are activități mult mai mici în fermentații decît în inocule, indiferent de tipul de inocul folosit.

Pe baza celor prezentate, putem aprecia că neagitarea inoculului se reflectă la nivelul unor parametri biochimici importanți, demonstrînd că cel puțin două activități metabolice sînt afectate : fenomenele oxidative (vezi activitatea catalazică) și însăși calea de biosinteză a lizinei (vezi activitatea aspartatkinazei). Aceste efecte asupra inoculului sînt însă reversibile ; ele nu se mențin în cursul fermentațiilor, nivelele enzimatice fiind aproximativ aceleași, indiferent dacă pentru fermentație s-au folosit inocule statice sau agitate. Am putea spune că în cursul fermentației celulele se redresează de sub efectul stressului de aerare, după cum sugerează producția finală de lizină, care nu prezintă diferențe evidente în funcție de tipul de inocul utilizat.

Dezvoltarea inoculului în medii cu EP în concentraţii diferite, respectiv de calităţi diferite, şi fermentaţiile cu aceste inocule în condiţii analoge de mediu au efecte relativ slabe asupra activităţii catalazelor.

Activitatea β-aspartatkinazei, îndeosebi în primele faze ale culturii (inocul, fermentaţie de 24 ore), este direct corelată în cele mai multe cazuri cu concentraţia EP din mediul de cultură. De asemenea, valorile mari ale enzimei la 24 de ore de fermentaţie corespund unei producţii mari de lizină la 72 de ore de fermentaţie. Aspartatkinaza este sensibilă atît la concentraţia EP din mediu, cît şi la calitatea acestuia. În mediile cu EP de calitate proastă, nivelul enzimei este mult mai mic şi practic independent de concentraţia EP, în comparaţie cu enzima din culturile realizate cu un EP de calitate bună.

Putem afirma că factorii activi din EP intervin în fiziologia şi în biochimia producătorului de lizină pe căi metabolice corelate direct cu aspartatkinaza, dar necorelate — sau neevident corelate — cu activitatea oxidoreducătoare sau cu procesele degradative ale acestor celule.

Prezentat la redacţie
la 15 decembrie 1979

* *Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti,*
** *Institutul de cercetări chimico-farmaceutice, Bucureşti*

β-ASPARTOKINASE AND CATALASE ACTIVITIES IN *CORYNEBACTERIUM MELASSECOLA* CULTURED IN UNFAVOURABLE STIRRING AND CULTURE MEDIUM

SUMMARY

Corynebacterium melassecola was cultured under standard conditions, as well as nonstirring and unfavourable conditions of culture (corn syrup of low quality and in nonoptimal concentrations, respectively). The effects were recorded both in inoculum and fermentation and were related with the overall lysine production. Nonstirring affected both catalase and aspartokinase, while the effects of unfavourable culture conditions were relevant at the level of aspartokinase mainly. The activity of this enzyme appeared directly correlated to the overall lysine synthesis.

The effects induced by the unfavourable culture conditions were in all cases reversible, so that the enzymes were rendered at their normal activity values at a certain interval after the cease of these conditions.

BIBLIOGRAFIE

1. O. A. Milstein, L. Ia. Vulf, *Vredenie biohimiio mikroorganizmov*, Riga, 1972, p. 71.
2. W. Fritsche, *Biochemische Grundlagen der industriellen Mikrobiologie*, Gustav Fischer Verlag, Jena, 1977, p. 105.
3. O. A. Thorup, Jr., W. B. Strole, B. S. Leavel, J. Lab. clin. Med., **58**, 122 (1961).
4. W. Woodbury, A. K. Spencer, M. A. Stehmann, Annal. Biochem., **44**, 301 (1971).
5. S. Black, N. H. Wight, J. biol. Chem., **213**, 27 (1955).

6. K. Nakayama, N. Kase, Agr. Biol. Chem., **38**, 5, 994 (1974).
7. Z. M. Zaitseva, Mikrobiol. Sintez., **11**, 3 (1966).
8. L. S. Kutseva, N. M. Kliueva, Prikl. Biohim. Mikrobiol., **5**, 556 (1969).
9. J. Hirose, H. Sonoda, K. Kinoshita, N. Okada, Agr. Biol. Chem., **31**, 1210 (1967).
10. Z. M. Zaitseva, T. A. Bachina, Prikl. Biohim. Mikrobiol., **11**, 189 (1975).
11. M. N. Rotmistrov, I. A. Vasilevskaia, A. A. Roy, Prikl. Biohim. Biofiz., **7**, 443 (1971).
12. L. Roman, D. Andrey, K. Stanislaw, Acta microbiol. polon., **17**, 309 (1968).
13. S. Dorothy, F. Deibel, R. Ninon, J. Bacteriol., **3**, 88 (1964).
14. S. E. Selga, în *Biosinteza microbiană a lizinei*, Zinatne, Riga, 1974, p. 54.
15. Z. M. Zaitseva, L. A. Muzichenko, L. A. Corianova, în *Biosinteza microbiană a lizinei*, Zinatne, Riga, 1974, p. 25.
16. Z. M. Zaitseva, I. P. Chernyshova, Int. Symp. Genetics of Industrial Mycroorganisms, Prague, 1970, p. 92.
17. Z. M. Zaitseva, I. P. Chernyshova, Prikl. Biohim. Mikrobiol., **11**, 350 (1975).
18. Z. V. Marshavina, E. N. Makarova, A. R. Mkhitaryan, N. R. Nikogosova, Prikl. Biohim. Mikrobiol., **11**, 661 (1975).
19. S. I. Auzan, M. E. Beker, în *Biosinteza microbiană a lizinei*, Zinatne, Riga, 1974, p. 27.

DEFINIŢIILE VIEŢII

EUGEN MACOVSCHI

Rezumat. După ce se arată diversitatea părerilor privind viaţa şi natura materiei vii, se dă o definiţie a vieţii, care reflectă starea actuală a cunoştinţelor în acest domeniu.

Deocamdată ştiinţa nu a descoperit natura vieţii şi de aceea încă nu s-a ajuns la definiţia exactă a ei. Numeroasele „definiţii" răspîndite în lucrările de specialitate nu sînt definiţii propriu-zise, ci mai degrabă un fel de caracterizări ale vieţii, bazate mai ales pe însuşirile şi comportările cunoscute ale materiei organismelor vii. Cîteva exemple sînt de ajuns pentru a ilustra această afirmaţie.

Viaţa este modul de existenţă a albuminei (corpurilor albuminoide)[1] şi constă în esenţă în schimbul de substanţe, adică în chimismul albuminei, caracterizat prin aceea că este un proces chimic ce se depăşeşte pe sine (1), (2). Viaţa este o formă biologică de mişcare a materiei, proprie albuminei, care înglobează în mod obligatoriu, sub un aspect depăşit şi subordonat, formele de mişcare mai simple (chimică, fizică, mecanică), dar nu se reduce la ele şi nici nu poate fi ruptă de ele (4). Viaţa este o forţă agresivă asimilatoare, care luptă prin reproducere împotriva degradării (5). Viaţa este însuşirea unor sisteme deschise, capabile de asimilare, catabolism, excreţie, înmulţire, ereditate, evoluţie etc., dotate cu autofuncţie şi cu autoreglare (W. Roux, citat după (6), p. 86). Viaţa este ansamblul de fenomene energetice pe care le manifestă anumite proteine, în special acelea de a se organiza sub forma de celulă sau de grup de celule ce constituie organismul capabil de a se multiplica şi de a se perpetua indefinit, dacă condiţiile mediului îi rămîn favorabile (7). Viaţa este o stare a materiei foarte stabilă, care foloseşte pentru elaborarea reacţiilor conservatoare informaţia codificată prin stările diferitelor molecule (A.A. Leapunov, citat după (6), p. 317).

Observăm că nu există o unitate de păreri. În aceste exemple, viaţa este considerată ca modul de existenţă a materiei, ca o formă de mişcare a materiei, ca o forţă, ca o însuşire a materiei, ca un fenomen energetic, ca o stare a materiei.

Nici în privinţa materiei organismelor vii, purtătoarea vieţii, încă nu s-a ajuns la o părere unanim acceptată. Deşi adepţii actualei concepţii moleculare despre natura viului, dominantă în biologia contemporană,

[1] Sub termenul de „albumină" sau „corp albuminoid", Fr. Engels nu înţelegea substanţe albuminoide sau proteine în sensul actual al cuvîntului, ci o formă a materiei pe care o denumim astăzi „biostructură" sau „materie biostructurată" (3).

sînt convinși că problema naturii materiei vii este pe deplin lămurită, totuși unii cercetători nu sînt de acord cu acest punct de vedere și elaborează ipoteze și teorii noi. Nu mă opresc asupra unor ipoteze mai vechi, formulate înainte de 1930 de către I. Alexander, F. Bottazzi, G. Bridges, M. Ferworn, N. Ivanov, E. Pflüger, R. Wiener și alții, ci voi menționa numai unele teorii mai noi, elaborate de E. Bauer (8), „teoria structurii dezechilibrate a moleculelor materiei vii", de V.V. Lepeoșkin (9), „teoria vitaidelor", de A. Frey-Wissling (10), „teoria punctelor de combinare", de G. Ling (11), „teoria asociației-inducției". Eu însumi am elaborat „teoria biostructurală a materiei vii" (3), (12), (13), (14) și am arătat că actuala concepție despre natura viului nu corespunde întru totul realității, ci constituie doar o teorie pe care am numit-o „teoria moleculară a materiei vii" (3).

Diversitatea părerilor privind atît viața cît și natura materiei vii ridică problema unei „definiții" a vieții, care să reflecte sumar ceea ce se cunoaște și nu se cunoaște în legătură cu ea. Pornind de aici și considerînd viața ca un fenomen, am ajuns la următoarea formulare bazată pe dialectica materialistă : „Viața este un fenomen biologic de esență materială, deocamdată necunoscut, care înglobează sub un aspect depășit și subordonat fenomene chimice, fizice și mecanice, dar se distinge de acestea și se manifestă numai în cadrul materiei vii, a cărei natură încă nu este pe deplin elucidată". Această definiție, ca toate celelalte, nu lămurește în fond nimic, dar, spre deosebire de ele, arată situația actuală a cunoștințelor noastre în problema vieții și a naturii materiei vii.

Prezentat la redacție
la 30 octombrie 1979

Universitatea București,
Facultatea de biologie

DEFINITIONS OF LIFE

SUMMARY

The diversity of opinions regarding life as well as the nature of living matter arises the problem of a "definition" of life that would point out all that is known and all that is not known about it. Starting from this point of view I have elaborated the following formulation : Life is a biological phenomenon of material essence, unknown at present, including as an overdone and subordinated aspect the chemical, physical and mechanical phenomena, but is distinct from these, and occurs within the living matter only, the nature of which is not fully elucidated.

BIBLIOGRAFIE

1. Fr. Engels, *Domnul Eugen Dühring revoluționează știința (Anti-Dühring)*, Edit. politică, București, 1966, p. 69, 85, 86.
2. Fr. Engels, *Dialectica naturii*, Edit. politică, București, 1966, p. 233.
3. E. Macovschi, *Teoria biostructurală și critica molecularismului contemporan*, în *Probleme actuale de biologie*, vol. III, Edit. didactică și pedagogică, București, 1978, p. 26, 6, 7—12, 39—45.

4. * * * *Bazele filozofiei marxiste*, Edit. politică, București, 1962, p. 100, 101, 103.
5. GR. T. POPA, Revista Fundațiilor, **11**, 290 (1944).
6. V. SĂHLEANU, B. STUGREN, *Mica enciclopedie de biologie și medicină*, Edit. științifică și enciclopedică, București, 1976.
7. A. MANUILA, L. MANUILA, M. NICOLE, H. LAMBERT, *Dictionnaire français de médecine et de biologie*, t. III, Ed. Masson et Comp., Paris, 1972, p. 1151.
8. E. BAUER, *Teoreticeskaia biologiea*, VIZM, Moskva, 1935.
9. V. V. LEPEOȘKIN, Biodynamika, **19**, 1 (1936).
10. A. FREY-WISSLING, *Submikroskopiceskoie stroenie protoplasmi i eeo proizvodnih*, Izd. inostrannoi literaturi, Moskva, 1950.
11. G. LING, Texas Rep. Biol. Med., **22**, 244 (1964).
12. E. MACOVSCHI, *Biostructura*, Edit. Academiei, București, 1969.
13. E. MACOVSCHI, *Natura și structura materiei vii*, Edit. Academiei, București, 1972.
14. E. MACOVSCHI, *Priroda i struktura jivoi materii*, Edit. Academiei, București, 1976.

ACTIVITATEA NITROGENAZICĂ ÎN CULTURI PURE DE BACTERII

I. MOISA*, I. VĂTAFU*, A. FĂRKAŞ**

Rezumat. S-a pus la punct tehnica reducerii acetilenei la etilenă, tehnică ce permite evidenţierea activităţii nitrogenazice la bacterii. S-a urmărit activitatea nitrogenazică în culturi pure aparţinînd la 108 tulpini de bacterii, reuşindu-se selectarea a 3 tulpini de *Klebsiella pneumoniae*, a 6 tulpini de *Azotobacter* şi a 8 tulpini de *Rhizobium* Nif$^+$, tulpini ce reprezintă un sistem convenabil pentru studii genetice şi biochimice asupra fixării asimbiotice a azotului. Cercetările au evidenţiat existenţa unei activităţi nitrogenazice semnificative la culturi de *Rhizobium* în stare asimbiotică şi au arătat că acest fenomen este dependent de tulpină.

Faptul că mai mulţi autori nu au putut demonstra fixarea azotului la culturi pure de *Rhizobium* în stare asimbiotică a condus la părerea că fixarea azotului are loc numai în condiţii de simbioză şi că infectarea plantei leguminoase reprezintă o condiţie prealabilă pentru expresia nitrogenazei.

Recent s-a descoperit independent în mai multe laboratoare, printre care şi în laboratorul nostru, că unele tulpini de *Rhizobium* sp., *Rhizobium japonicum*, *Rh. leguminosarum*, *Rh. trifolii*, *Rh. meliloti* şi *Rh. vigna* pot în stare asimbiotică să reducă acetilena la etilenă (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). Existenţa unei activităţi nitrogenazice a culturilor pure de *Rhizobium* a fost demonstrată prin încorporarea de N^{15} (6), (7) şi prin inhibarea activităţii nitrogenazice de către inhibitori specifici (3). Valorile activităţii nitrogenazice au fost afectate de proprietăţile tulpinilor şi de compoziţia mediului de cultură (5).

Tulpinile de *Rhizobium* capabile de a fixa asimbiotic azotul reprezintă un sistem convenabil pentru studii genetice şi biochimice asupra biologiei moleculare a procesului de fixare a azotului.

Cercetările care fac obiectul lucrării de faţă au fost axate pe următoarele aspecte :

— punerea la punct a tehnicii de reducere a acetilenei la etilenă, tehnică ce permite evidenţierea bacteriilor care prezintă în genom gene implicate în fixarea biologică a azotului (genele nif) ; aceste gene codifică componentele de natură proteică (componentul Fe şi componentul Mo—Fe) ce alcătuiesc complexul enzimatic denumit nitrogenază ;

— urmărirea existenţei unei activităţi nitrogenazice la 13 tulpini de *Rhizobium* în stare asimbiotică, în scopul lămuririi problemei controversate dacă activitatea enzimatică se manifestă şi în lipsa plantei-gazdă ;

— urmărirea în condiţii de aerobioză şi de anaerobioză a activităţii nitrogenazice la 95 de tulpini de bacterii aparţinînd genurilor *Escherichia*,

Klebsiella, *Azotobacter*, *Serratia* şi *Shigella*; aceste studii au avut drept scop selectarea unor tulpini bacteriene Nif+ care să poată fi folosite în cercetările de transfer al genelor fixatoare de azot la procariote.

MATERIAL ŞI METODE

Tulpini bacteriene. Am urmărit prin testul reducerii acetilenei la etilenă existenţa unei activităţi nitrogenazice la 108 tulpini de colecţie de *Escherichia coli* (6 tulpini), *Klebsiella pneumoniae* (71 tulpini), *Rhizobium* (13 tulpini), *Azotobacter* (16 tulpini), *Serratia marcescens* (1 tulpină), *Shigella flexneri* (1 tulpină). Tulpinile de *K. pneumoniae*, *Shigella*, *E. coli* şi *Serratia* provin din colecţia Institutului „Dr. I. Cantacuzino" din Bucureşti, tulpinile de *Azotobacter* din colecţia laboratorului nostru, iar proveniența tulpinilor de *Rhizobium* este trecută în tabela 2.

Medii de cultură. Bacteriile supuse testului reducerii acetilenei la etilenă au fost cultivate într-un mediu de cultură lipsit de ionul NH_4, recomandat de Cannon şi colab. (10), suplimentat cu 0,3 mg/l yeast extract.

Tehnica reducerii acetilenei la etilenă. Testul reducerii acetilenei la etilenă a fost folosit pentru a evidenţia existenţa unei activităţi nitrogenazice la tulpinile bacteriene testate, fapt ce implică prezenţa în genomul acestora a genelor responsabile de fixarea biologică a azotului molecular.

Sursa de acetilenă. Acetilena a fost preparată pornind de la carbura de calciu şi apă: 1 g carbură de calciu s-a introdus în aproximativ 15 ml apă distilată în tubul mic al unui aparat simplu construit de noi (fig. 1). La tubul respectiv s-a pus imediat un dop de cauciuc; acetilena, care este rapid degajată, dislocuieşte aerul din tubul de cauciuc. Probele de acetilenă

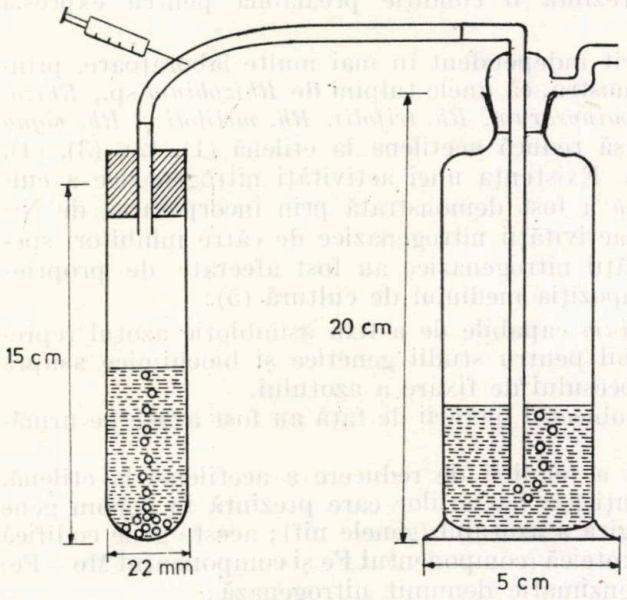


Fig. 1. — Schema aparatului utilizat pentru producerea de acetilenă.

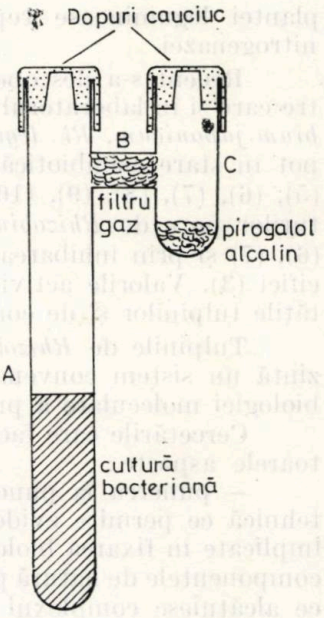


Fig. 2. — Schema recipientelor folosite în testul reducerii acetilenei la etilenă (condiţii de anaerobioză).

au fost recoltate prin înţeparea tubului de cauciuc cu o seringă de plastic şi injectate imediat în sistemul de testare. Probele au fost recoltate numai după îndepărtarea aerului care a emers cu o presiune hiperbarică marginală, deoarece astfel aerul poate pătrunde în seringă şi afecta determinările.

Cultivarea bacteriilor în condiții de aerobioză s-a făcut în flacoane Erlenmeyer de 100 ml, în care s-au introdus 10 ml mediu fără NH_4^+ ; flacoanele au fost inoculate cu 0,5 ml cultură bacteriană și incubate la 28°C (tulpinile de *Rhizobium* și de *Azotobacter*) și la 37°C (celelalte tulpini analizate). După 48 de ore de incubare s-au injectat 2 ml acetilenă, iar culturile au fost incubate în continuare la temperatura inițială timp de 24 de ore. După acest interval s-au recoltat din flacoane probe omogene de gaz (0,5— 1 ml) pentru a fi examinate la gaz-cromatograf.

Cultivarea bacteriilor în condiții de anaerobioză s-a efectuat în recipiente speciale, construite de noi, după modelul tuburilor Pankhurst (11), (12), (13) (fig. 2).

Tubul orizontal B al recipientelor a fost umplut ferm cu un dop de vată nehidrofilă ; după sterilizare s-au introdus în tubul A 10 ml din mediul de cultură fără azot, s-au inoculat bacteriile și s-a înlocuit dopul de vată cu un dop de cauciuc special, steril. În tubul lateral C s-au introdus 0,75 ml soluție alcalină conținînd 10% NaOH și 15% K_2CO_3 și 0,75 ml soluție de pirogalol saturată, apoi s-a astupat și el cu un dop de cauciuc steril. După aproximativ o oră s-au injectat prin tubul lateral 10 ml aer pentru a realiza o presiune pozitivă în tub. După creșterea bacteriilor, s-a injectat 1 ml acetilenă prin tubul lateral C, amestecul gazos din recipiente fiind omogenizat cu ajutorul siringii de injecție. Culturile cu acetilenă au fost incubate în continuare timp de 24 de ore la temperatura de 37°C, după care s-au recoltat prin dopul tubului A probe din amestecul gazos (0,5—1 ml), probe ce au fost examinate apoi la gaz-cromatograful cu ionizare în flacără. S-a folosit gaz-cromatograful Perkin-Elmer Fll, probele fiind examinate pe coloane de sticlă lungi de 1 m, cu diametrul de 3 mm, umplute cu Porapak T. Activitatea nitrogenazică a fost exprimată în nmol C_2H_4/h/mg substanță uscată. S-a urmărit eventuala producere endogenă de C_2H_4 la probe fără C_2H_2.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 prezentăm rezultatele cercetărilor noastre privind existența unei activități nitrogenazice (a genelor *nif*) la 108 tulpini de bacterii testate în condiții de aerobioză și de anaerobioză.

Tabela 1

Selectarea tulpinilor bacteriene Nif + prin testul reducerii acetilenei la etilenă

Tulpina	Număr tulpini testate	Reducerea acetilenei în condiții anaerobe		Reducerea acetilenei în condiții aerobe	
		Nif+	Nif−	Nif+	Nif−
Escherichia coli	6	0	6	0	6
Klebsiella pneumoniae	71	3	68	2	69
Rhizobium sp.	13	—	—	8	5
Azotobacter	16	—	—	6	10
Serratia marcescens	1	0	1	0	1
Shigella flexneri	1	0	1	0	1

Se remarcă faptul că, din cele 71 de tulpini de *Klebsiella pneumoniae* testate, numai trei au prezentat o activitate nitrogenazică semnificativă, reducînd acetilena la etilenă în condiții de anaerobioză.

În mecanismul fixării biologice a azotului, rolul esențial îl joacă nitrogenaza. Bacteriile și bacteriile albastre-verzi (cianobacteriile) sînt singurele organisme cunoscute ca prezentînd capacitatea de a fixa azotul molecular, ele caracterizîndu-se prin existența în genomul lor a unor gene (genele nif) care codifică proteinele ce alcătuiesc sistemul enzimatic nitrogenazic. Acest complex este alcătuit din două metaloproteine distincte

(fig. 3). Prima proteină (componentul I), numită proteina Mo-Fe, este tetramerică, cu o greutate moleculară de 220 000 şi conţine 2 atomi de molibden şi 32 atomi de fier (14). Atomii de molibden şi 8 dintre atomii de fier intră în alcătuirea unei subunităţi distincte, denumită cofactorul

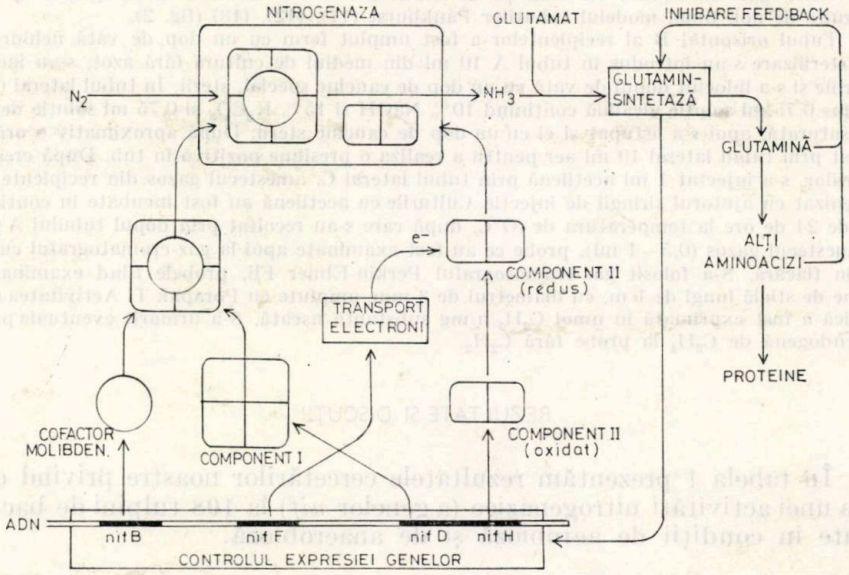


Fig. 3. — Fixarea biologică a azotului molecular prin intermediul nitrogenazei (15).

Mo. Cea de-a doua proteină (componentul II), numită proteina Fe, are o greutate moleculară de 60 000 şi constă din două subunităţi proteice identice, care conţin 4 atomi de fier (15).

În fixarea azotului intervine în primul rînd reducerea componentului II al nitrogenazei de către o proteină transportoare de electroni; componentul II redus reacţionează cu ATP şi apoi complexul format reduce componentul I. În final, componentul I reduce azotul molecular, formînd amoniac (15).

Nu a fost evidenţiată nici o substanţă intermediară între azot şi amoniac; de aceea, toate stadiile intermediare în fixarea biologică a azotului rămîn legate de nitrogenază.

O ipoteză este că un produs intermediar în fixarea azotului ar fi o diimidă, o moleculă cu structura NH = NH, existînd astfel o similitudine între acest proces şi mecanismul prin care nitrogenaza reduce acetilena la etilenă (fig. 4) (15). Pe această similitudine se bazează testul reducerii acetilenei la etilenă, pe care noi l-am folosit în lucrarea de faţă pentru a evidenţia existenţa unei activităţi nitrogenazice în culturi pure de bacterii (15). Tulpinile bacteriene Nif$^+$ erau capabile să reducă acetilena la etilenă, pe cînd cele lipsite de genele fixatoare de azot (Nif$^-$) nu prezentau această proprietate.

În tabela 2 redăm rezultatele privind activitatea nitrogenazică (exprimată în nmol C_2H_4/h/mg substanţă uscată) evidenţiată la cele trei

tulpini de *K. pneumoniae* Nif$^+$ (*K. pneumoniae* I. C. 11890/79, *K. pneumoniae* I.C. 11878/67 și *K. pneumoniae* I. C. 11865) comparativ cu activitatea prezentată de tulpina de *K. pneumoniae* M_5a_1, una din puținele tulpini de *Klebsiella* ce posedă în genomul lor genele implicate în fixarea

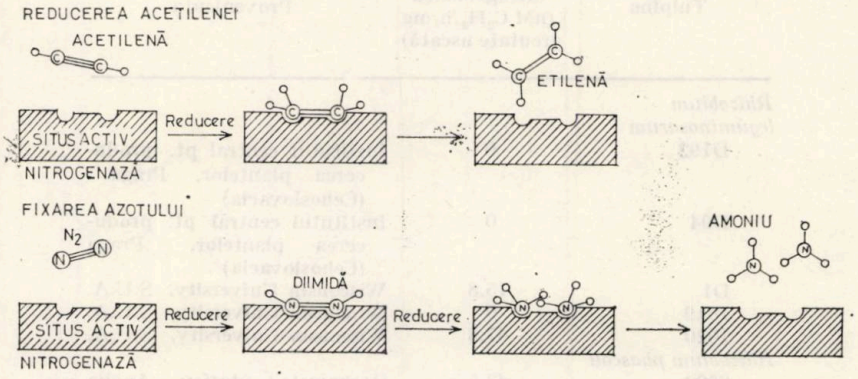


Fig. 4. — Secvențele ipotetice privind omologia dintre reducerea acetilenei și cea a azotului de către nitrogenază (15).

biologică a azotului. Tulpinile selectate de noi, I.C. 11890/79 și I.C. 11878/67, au prezentat o activitate nitrogenazică mai ridicată decît cea găsită la tulpina M_5a_1, fapt ce ne-a determinat să le folosim în cercetările noastre ca donori în transferul genelor nif la procariote. Aceste două tulpini au avut o activitate nitrogenazică semnificativă și atunci cînd testarea s-a făcut în condiții de aerobioză, fapt oarecum surprinzător ținînd seama de sensibilitatea nitrogenazei la oxigen.

Din 16 tulpini de *Azotobacter* testate în condiții de aerobioză, numai 6 au prezentat un fenotip Nif$^+$, restul nefiind capabile să reducă acetilena la etilenă ; probabil, ele reprezintă mutanți Nif$^-$, asupra cărora vor trebui efectuate cercetări ulterioare în scopul stabilirii precise a deficiențelor lor genomice.

Nici o tulpină de *E. coli*, *Serratia* sau *Shigella*, indiferent de condițiile de testare folosite, nu a prezentat activitatea nitrogenazică semnificativă, ele urmînd a fi folosite ca tulpini acceptoare în cercetările noastre de transfer al genelor nif la procariote.

Rezultatele cercetărilor privind existența unei activități nitrogenazice la culturi pure de *Rhizobium* (în stare asimbiotică), în scopul lămuririi problemei controversate dacă activitatea enzimatică se manifestă și în lipsa plantei-gazdă, le prezentăm în tabela 2. Din cele 13 tulpini de *Rhizobium* testate în condiții de aerobioză, 8 au prezentat o activitate nitrogenazică semnificativă, fapt ce pledează în favoarea afirmației că condiționarea activității nitrogenazice la bacteriile din genul *Rhizobium* de către constituenți ai plantei-gazdă nu reprezintă o necesitate.

Valorile obținute în formarea etilenei (15,8—47,8 nmol C_2H_4/h/mg s.u.) sînt comparabile cu cele raportate de Tjepkema și Evans (9), precum și de Evans și Keister (1) și arată că la unele specii de *Rhizobium* sinteza nitrogenazei poate avea loc în condiții de asimbioză.

Tabela 2

Reducerea acetilenei de către tulpini de *Rhizobium* şi *Klebsiella pneumoniae* în mediul lichid

Tulpina	Activitatea nitrogenazică (nM C_2H_4/h/mg greutate uscată)	Proveniența
Rhizobium leguminosarum		
D192	0	Institutul central pt. producerea plantelor, Praga (Cehoslovacia)
D94	0	Institutul central pt. producerea plantelor, Praga (Cehoslovacia)
D1	15,8	Wisconsin University, S.U.A.
1019	0	Wisconsin University, S.U.A.
1020	47,8	Wisconsin University, S.U.A.
Rhizobium phaseoli		
3602	43,5	Rothamsted Station, Anglia
Rhizobium meliloti		
T36	0	Institutul central de cercetări agronomice, București
Sa 1OM	46,5	Centrul național de cercetări agronomice, Versailles (Franța)
2003	0	Rothamsted Station, Anglia
Su 258	36,5	Universitatea Sydney, Australia
Rhizobium sp.		
X 8	40,2	Laboratorul de microbiologie, Universitatea din București
RL 3	26,2	Laboratorul de microbiologie, Universitatea din București
D21	30,9	Institutul central pt. producerea plantelor, Praga (Cehoslovacia)
Klebsiella pneumoniae		
I.C. 11890(79)	99,5	Institutul „Dr. I. Cantacuzino", București
I.C. 11878(67)	47,4	Institutul „Dr. I. Cantacuzino", București
I.C. 11865	7,1	Institutul „Dr. I. Cantacuzino", București
M_5a_1	29,4	Universitatea din Sussex, Anglia

Trei tulpini de *Rh. leguminosarum* (D192, D94 și 1019) și două tulpini de *Rh. meliloti* (T36 și 2003) nu au fost capabile de fixare asimbiotică a azotului. Acest fapt, corelat cu observația că există diferențe semnificative în nivelul activității nitrogenazei prezentate de diferite tulpini de *Rhizobium* testate (*Rh. leguminosarum* D1 = 15,8 nmol C_2H_4/h/mg greutate uscată, iar *Rh. leguminosarum* 1020 = 47,8 nmol C_2H_4/h/mg s.u.), ne sugerează că prezența și nivelul activității specifice de producere a C_2H_4 sînt dependente de tulpină.

Cercetări viitoare la nivel molecular vor trebui să lămurească de ce la unele tulpini de *Rhizobium* se poate evidenția o activitate nitrogenazică în condiții de asimbioză, pe cînd la altele nu se evidențiază.

Faptul că în experiențele noastre tulpini de *Rh. leguminosarum*, *Rh. phaseoli* și *Rh. meliloti* au putut fixa azotul molecular în culturi pure le recomandă ca un sistem convenabil pentru studii genetice și biochimice asupra procesului de fixare asimbiotică a azotului molecular.

CONCLUZII

1. S-a pus la punct tehnica de reducere a acetilenei la etilenă, tehnică ce permite selectarea bacteriilor Nif$^+$.
2. S-a evidențiat o activitate nitrogenazică semnificativă la 3 tulpini de *K. pneumoniae* din 71 testate (condiții de anaerobioză).
3. Din 16 tulpini de *Azotobacter* testate în condiții de aerobioză, 6 au prezentat un fenotip Nif$^+$.
4. La 8 tulpini de *Rhizobium*, din 13 testate, s-a evidențiat existența unei activități nitrogenazice semnificative, dovedindu-se că aceste tulpini pot fixa azotul molecular în condiții de asimbioză.
5. Nici o tulpină de *E. coli*, *Serratia* sau *Shigella*, indiferent de condițiile de testare folosite, nu a prezentat activitate nitrogenazică semnificativă.

Prezentat la redacție
la 1 august 1979

* *Institutul de științe biologice, București*
** *Institutul de tehnologie izotopică și moleculară, Cluj-Napoca*

NITROGENASE ACTIVITY IN BACTERIA PURE CULTURES

SUMMARY

The technique of reducing acetylene to ethylene was performed; it allows the evident nitrogenic activity in bacteria. The nitrogenase activity in pure cultures was investigated in 108 strains of bacteria, with a successful selection of 3 strains of *Klebsiella pneumoniae*, 6 strains of *Azotobacter* and 8 strains of *Rhizobium* Nif$^+$. These strains are a suitable system for a genetic and biochemical study on the asymbiotic fixation of nitrogen. The investigations pointed out the existence of a significant nitrogenase activity in *Rhizobium* cultures in asymbiotic stage, the phenomenon being dependent on the strain.

BIBLIOGRAFIE

1. W. R. Evans, D. L. Keister, Canad. J. Microbiol., **22**, 949 (1976).
2. A. H. Gibson, W. R. Scrowcroft, J. J. Child, J. D. Pagan, Microbiology, **108**, 45 (1976).
3. D. L. Keister, J. Bacteriol., **123**, 1265 (1975).
4. W. G. W. Kurz, T. A. La Rue, Nature, **256**, 407 (1975).

5. Z. Lorkiewicz, R. Russa, T. Urbanik, Acta microbiol. pol., **27**, *1*, 5 (1978).
6. J. A. Mc Comb, J. Elliot, M. L. Dilworth, Nature, **256**, 409 (1975).
7. J. D. Pagan, J. J. Child, W. R. Scrowcroft, A. H. Gibson, Nature, **256**, 406 (1975).
8. A. N. Parijkaya, T. A. Kalininskaya, Mikrobiologia, **66**, 181 (1977).
9. J. Tjepkema, H. J. Evans, Biochem. Biophys. Res. Commun., **65**, 625 (1975).
10. F. C. Cannon, R. A. Dixon, J. R. Postgate, S. B. Primrose, J. gen. Microbiol., **80**, 241 (1974).
11. E. S. Pankhurst, Lab. Pract., **16**, *1*, 58 (1967).
12. J. R. Postgate, J. gen. Microbiol., **63**, 589 (1970).
13. J. R. Postgate, *Methods in Microbiology*, vol. VI B, Springer-Verlag, Berlin, 1972, p. 353.
14. H. Dalton, L. E. Mortenson, Bacteriol. Rev., **36**, *2*, 231 (1972).
15. W. J. Brill, Scient. Amer., 68 (1977).

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTE SUPERIOARE. XIV. PIGMENŢII CAROTENOIDICI ŞI CLOROFILIENI DIN PATRU SPECII ALE GENULUI *EUPHORBIA*

G. NEAMŢU, GH. ILLYES

Rezumat. S-au determinat pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din frunze şi flori de *Euphorbia amygdaloides, E. cyparissias, E. platyphyllos* şi *E. salicifolia.*

În frunze, pe lîngă carotenoidele comune, frecvent întîlnite în ţesuturile verzi, s-au identificat mutatocromul şi flavocromul.

Raportul dintre principalele carotenoide foliare — luteina şi β-carotina — — este supraunitar, la fel ca la majoritatea plantelor superioare. În flori se găsesc un număr relativ mare de carotenoide epoxidice şi furanoidice, dintre care s-au identificat neoxantina, violaxantina, anteraxantina, luteocromul, eloxantina, flavoxantina, mutatocromul şi flavocromul. Dintre xantofile s-au identificat numai luteina şi zeaxantina, iar dintre carotenoidele hidrocarburice α- şi β-carotina.

Dintre carotenoidele caracteristice, mai rar întîlnite în natură, cu eventuală importanţă chemotaxonomică pentru toate plantele din genul *Euphorbia,* menţionăm flavocromul şi mutatocromul, carotenoide furanoidice identificate atît în frunze cît şi în flori.

Raportul dintre conţinutul clorofilei a şi b este cuprins în frunze între 2,20 şi 1,93, iar în flori între 4,21 şi 2,78.

În cadrul cercetărilor chemotaxonomice pe care le efectuăm la plantele superioare s-au studiat pigmenţii carotenoidici şi clorofilieni din patru specii laticifere ale genului *Euphorbia*, cu scopul de a cunoaşte felul şi conţinutul pigmenţilor menţionaţi şi de a stabili eventualele carotenoide specifice şi caracteristice acestui important gen de plante.

Plantele laticifere din genul *Euphorbia* conţin în organele vegetative un suc lăptos (latex), toxic şi iritant, bogat în terpene, taninuri, răşini, alcaloizi, uleiuri eterice etc. (1) — (2). Unele specii, ca *E. esula, E. peplis*, sînt atît de iritante şi vezicante încît oamenii le întrebuinţează pentru cauterizarea negilor şi a bătăturilor (1).

Cu toate că plantele din genul *Euphorbia* au un areal mare de răspîndire, fiind larg reprezentate şi în flora ţării noastre, ele n-au fost cercetate pînă în prezent sub aspectul pigmenţilor carotenoidici şi nici al celor clorofilieni.

În această lucrare se prezintă pigmenţii carotenoidici şi clorofilele a şi b din frunze şi flori de *Euphorbia amygdaloides* L., *E. cyparissias* L., *E. platyphyllos* L. şi *E. salicifolia* Host Syn.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru identificarea şi determinarea carotenoidelor şi a clorofilelor din frunzele şi florile plantelor cercetate s-a folosit material proaspăt, recoltat în primăvara anilor 1978 şi 1979, din judeţul Cluj. S-a utilizat material proaspăt pentru a evita izomerizarea şi degradarea pigmenţilor carotenoidici în timpul uscării plantelor, sub acţiunea latexului ce-l conţin. Extragerea

pigmenților din frunze și flori s-a făcut cu un amestec de eter de petrol-acetonă-metanol, în raport de 6 : 3 : 1, pînă ce extractul a rămas incolor.

Pentru separarea și purificarea pigmenților s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant amestec de oxid de magneziu și nisip fin, în raport de 2 : 1 în greutate. Purificarea carotenoidelor s-a făcut și pe coloane adsorbante, formate din oxid de magneziu și Hyflo Super Cell, în raport de 1 :2 în volum. Developarea coloanelor cromatografice s-a făcut cu un amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în raport de 6 : 2 : 2. Pentru identificarea carotenoidelor și a clorofilelor s-a folosit și cromatografia în strat subțire, utilizîndu-se ca adsorbant oxid de magneziu, silicagel și gips deshidratat, în raport de 1 : 1 : 0,5. Ca developant al plăcilor cromatografice s-a folosit amestec de eter de petrol-acetonă-alcool metilic, în raport de 25 : 3 : 1.

Saponificarea pigmenților carotenoidici din flori s-a făcut la întuneric, cu soluție etanolică de hidroxid de potasiu 8%, timp de 12 ore, la temperatura camerei.

Identificarea carotenoidelor și a clorofilelor, precum și determinarea conținutului acestora s-au efectuat prin metode cromatografice și spectroscopice, la fel ca în lucrările anterioare (3), (4), (5).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conținutul pigmenților carotenoidici și al clorofilelor a și b din frunzele plantelor cercetate se prezintă în tabela 1.

Tabela 1

Conținutul pigmenților carotenoidici și al clorofilelor a și b din frunze de *Euphorbia amygdaloides*, *E. cyparissias*, *E. plathyphyllos* și *E. salicifolia*, în μg/g material proaspăt

Pigmenți	*Euphorbia*			
	amygdaloides	*cyparissias*	*platyphyllos*	*salicifolia*
Pigmenți carotenoidici				
Neoxantină	86	120	63	78
Violaxantină	68	78	52	63
Eloxantină	24	20	18	23
Luteină	324	336	283	251
Mutatocrom	16	20	15	12
Flavocrom	12	10	9	6
β-Carotină	295	306	265	224
α-Carotină	48	56	51	29
Total carotenoide	873	946	756	686
Pigmenți clorofilieni				
Clorofila a	745	747	658	667
Clorofila b	386	380	321	302
Total clorofile	1131	1127	979	969
Raport conținut clorofila a/clorofila b	1,93	1,96	2,04	2,20

În frunzele plantelor cercetate, alături de carotenoide comune, frecvente în țesuturile verzi (neoxantina, violaxantina, eloxantina, luteina, α- și β-carotina), se găsesc carotenoide mai rar întîlnite în plante. Dintre acestea menționăm două carotenoide furanoidice, mutatocromul și

flavocromul, care se găsesc foarte rar în frunze (6). Conținutul principalelor carotenoide foliare — luteina și β-carotina — este supraunitar, la fel ca la majoritatea plantelor superioare.

Ca aspect caracteristic, determinat probabil de prezența latexului în aceste plante, este prezența unui număr relativ mare de carotenoide epoxidice și furanoidice (neoxantina, violaxantina, eloxantina, mutatocromul, flavocromul). Dintre carotenoidele hidrocarburice s-au identificat α- și β-carotina, iar dintre xantofile numai luteina.

Raportul dintre conținutul clorofilei a și b din frunze este cuprins între 2,20 și 1,93, asemănător celorlalte plante superioare.

Conținutul pigmenților carotenoidici și al clorofilelor a și b din flori se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conținutul pigmenților carotenoidici și al clorofilelor a și b din flori de *Euphorbia amygdaloides, E. cyparissias, E. platyphyllos* și *E. salicifolia*, în μg/g material proaspăt

Pigmenți	*Euphorbia*			
	amygdaloides	*cyparissias*	*platyphyllos*	*salicifolia*
Pigmenți carotenoidici				
Neoxantină -ester	58	98	72	66
Violaxantină-ester	120	160	106	84
Anteraxantină-ester	38	75	64	48
Zeaxantină-ester	46	110	40	32
Luteocrom-ester	16	26	14	12
Eloxantină-ester	86	120	140	104
Flavoxantină-ester	34	57	72	68
Luteină-ester	353	386	246	280
Mutatocrom	12	23	20	17
Flavocrom	6	4	8	5
β-Carotină	256	278	185	146
α-Carotină	21	34	27	18
Total carotenoide	1046	1371	994	880
Pigmenți clorofilieni				
Clorofila a	234	287	316	248
Clorofila b	84	93	75	65
Total clorofile	318	380	391	313
Raport conținut clorofila a/clorofila b	2,78	3,08	4,21	3,81

Din determinările efectuate reiese că florile acestor specii (aranjate în inflorescențe denumite ciațiu) conțin un număr mare și variat de pigmenți carotenoidici.

Sub aspectul compoziției, la fel ca în frunze, predomină carotenoidele oxigenate față de cele hidrocarburice.

După structura moleculară, carotenoidele identificate pot fi grupate în următoarele categorii :

— carotenoide epoxidice (neoxantina, violaxantina, anteraxantina, eloxantina) ;

— carotenoide furanoidice (luteocromul, flavoxantina, mutatocromul, flavocromul);

— xantofile (zeaxantina, luteina);

— carotenoide hidrocarburice (α- și β-carotina).

Ca aspect caracteristic apare și în flori predominarea carotenoidelor epoxidice și furanoidice față de xantofile și carotenoidele hidrocarburice. Carotenoidele ce conțin grupări hidroxilice se găsesc în flori sub formă de ester, iar în frunze în stare liberă. Dintre pigmenții carotenoidici identificați predomină sub aspect cantitativ, la fel ca în frunze, luteina și β-carotina.

Întrucît flavocromul și mutatocromul se găsesc atît în frunze cît și în flori, considerăm că acești pigmenți, deși se află în cantitate mică, sînt caracteristici pentru aceste plante și pot prezenta importanță chemotaxonomică pentru întregul gen *Euphorbia*. Cercetările ulterioare efectuate cu alte plante din acest gen vor putea confirma sau infirma această presupunere.

Între pigmenții carotenoidici și clorofilieni din frunzele și florile speciilor cercetate nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, care nu au o semnificație importantă. Un conținut mai ridicat de carotenoide prezintă *E. cyparissias*, iar mai sărac *E. salicifolia*.

În flori nu s-au identificat carotenoide cetonice și nici carotenoide cu structură monociclică. Alături de carotenoide, în flori se găsesc și pigmenți flavonoidici (7) — (8), care se separă de carotenoide în timpul extragerii și al saponificării.

Pigmenții clorofilieni din flori provin din receptacul și din codițele florilor. Raportul dintre conținutul clorofilei a și b este mai mare decît în frunze, fiind cuprins între 4,21 și 2,78.

CONCLUZII

Plantele laticifere cercetate au un conținut ridicat și variat de pigmenți carotenoidici. Dintre pigmenții carotenoidici identificați predomină, atît în frunze cît și în flori, carotenoidele epoxidice și furanoidice față de xantofile și carotenoidele hidrocarburice. Latexul din plante influențează probabil formarea carotenoidelor cu grupări epoxidice și furanoidice.

Carotenoidele cu grupări hidroxilice se găsesc în frunze în stare liberă, iar în flori sub formă de esteri.

Dintre carotenoidele caracteristice pentru plantele cercetate, cu eventuală importanță chemotaxonomică pentru întregul gen, menționăm mutatocromul și flavocromul.

Între pigmenții carotenoidici și clorofilieni din plantele cercetate nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.

Prezentat la redacție
la 15 septembrie 1979

Institutul agronomic „Dr. P. Groza”,
Cluj-Napoca

CHEMOTAXONOMICAL RESEARCHES IN HIGHER PLANTS. XIV. CAROTENOID AND CHLOROPHYLL PIGMENTS FROM FOUR SPECIES OF GENUS *EUPHORBIA*

SUMMARY

Carotenoid and chlorophyll pigments from the leaves and flowers of *Euphorbia amygdaloides*, *E. cyparissias*, *E. platyphyllos* and *E. salicifolia* were determined.

Besides the common carotenoids frequently present in plant green tissues mutatochrome and flavochrome were found in the leaves.

The ratio between the principal carotenoids from leaves — lutein and β-carotene — was supraunitary, as in the leaves of the majority of land higher plants.

More epoxy and furanoid carotenoids were found in the flowers from which neoxanthin, violaxanthin, anteraxanthin, luteochrome, eloxanthin, flavoxanthin, mutatochrome and flavochrome were identified. Among xanthophylls only lutein and zeaxanthin were identified and from hydrocarbon carotenoids only α- and β-carotene were identified.

Among the characteristic carotenoids, not so frequently met in nature, having a chemotaxonomical significance for all plants of *Euphorbia* genus, are to be mentioned flavochrome and mutatochrome, which were found both in leaves and flowers.

The ratio between the content of a-chlorophyll and b-chlorophyll was between 2.20—1.93 in leaves and 4.21—2.78 in flowers.

BIBLIOGRAFIE

1. T. Săvulescu, *Flora Republicii Populare Române*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1953, vol. II, p. 296.
2. F. Crăciun, O. Bojor, M. Alexan, *Farmacia naturii*, Edit. Ceres, Bucureşti, 1976, p. 146.
3. G. Neamţu, S. Bilăuş, T. Laszlo, K. L. Simpson, Rev. roum. Biochim., **13**, 203 (1976).
4. G. Neamţu, Gh. Illyes, St. cerc. biochim., **21**, 63 (1978).
5. G. Neamţu, Gh. Illyes, T. Laszlo, St. cerc. biochim., **22**, 175 (1979).
6. R. J. H. Williams, T. W. Goodwin, Phytochemistry, **6**, 1037 (1967).
7. N. A. Abdel Salem, A. El. Sayed Mahmud, S. M. Khafagy, Pharmazie, **30**, 402 (1975).
8. A. M. Rizk, H. Rimpler, S. I. Ismail, Fitoterapia, **48**, 99 (1977).

ACTIVITATEA LACTAZICĂ ŞI MALTAZICĂ A UNOR TULPINI DE *ASPERGILLUS*

ANCA ROŞEANU*, S. VASU**

Rezumat. S-a urmărit activitatea β-galactozidazei (lactazei) şi α-glucozidazei (maltazei) din unele tulpini de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. orysae*, *A. terreus*). *A. niger* şi *A. orysae*, cultivate pe mediul sintetic Raulin şi pe tărîţe de grîu, indică activitate β-galactozidazică şi α-glucozidazică. Cele două enzime sînt produse intracelular şi constitutiv de către *A. niger*. *A. orysae* produce α-glucozidaza intracelular şi β-galactozidaza extracelular.

Glicozidhidrolazele produse de diferite microorganisme prezintă importanţă practică, preparate cu astfel de activităţi fiind solicitate în industria alimentară (1) şi în terapia intoleranţelor la unele diglucide (2), (3). Dintre aceste enzime, de o atenţie mai deosebită s-a bucurat în ultimul timp lactaza (β-galactozidaza ; E.C. 3.2.1.23) şi în mai mică măsură maltaza (α-glucozidaza ; E.C. 3.2.1.20).

Din preparatul comercial Rhozyme HP—150 (Rohn & Hass Company, Philadelphia), obţinut din *A. niger*, Bahl şi Agrawal (4) au purificat şi caracterizat, între alte glicozidaze, şi β-galactozidaza ; Borghum şi Sternberg (5), din culturi de *A. foetidus*, şi recent Tanaka şi colab. (6), Park şi colab. (7), din culturi de *A. orysae*, au obţinut şi studiat aceeaşi enzimă.

Preocupîndu-ne obţinerea unor preparate glicozidazice, în această lucrare prezentăm rezultatele privind activitatea lactazică şi maltazică din unele tulpini de *Aspergillus* cultivate în diferite condiţii şi pe diferite medii de cultură.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit tulpinile : *A. niger* ICA—34 (colecţia ICICA-Bucureşti), *A. orysae*—26 şi *A. terreus*—28 (colecţia ISB-Bucureşti).

Mediile de cultură şi condiţiile de cultivare. Tulpinile de *Aspergillus* au fost cultivate pe mediul lichid Raulin (8), în flacoane Erlenmeyer de 750 ml cu 200 ml mediu, însămînţate cu 6×10^6 spori, în condiţii statice şi de agitare rotativă (150 rot/min), la 28°C, timp de 3—5 zile.

S-au obţinut, de asemenea, culturi pe mediu semisolid, alcătuit din 200 g tărîţe de grîu şi 240 ml apă de la robinet, sterilizat la 1,5 atm, timp de 30 min ; 200 g mediu a fost însămînţat cu 10^7 spori, obţinîndu-se culturi în vîrstă de 3—5 zile la 30°C.

Prelucrarea culturilor. Miceliul crescut pe mediile lichide, separat prin filtrare pe pînză de nylon, spălat de 3 ori cu apă distilată rece şi uscat cu hîrtie de filtru, a fost mojarat la rece cu nisip de cuarţ şi suspendat în apă distilată 1/10 (g/v), fiind centrifugat la 4000 rot/min timp de 20 min. Supernatantul astfel obţinut constituia omogenatul de miceliu.

Mediul de cultură şi apele de spălare a miceliului au fost aduse la 200 ml, după care au fost centrifugate la 4000 rot/min timp de 20 min.

Culturile obținute pe mediul cu tărițe de grîu au fost suspendate în apă distilată 1/10 (g/v), fiind extrase prin agitare continuă la temperatura camerei timp de 4 ore. După filtrare prin pînză de nylon, se centrifughează la 4000 rot/min timp de 20 min. Supernatantul obținut reprezintă extractul enzimatic al acestor culturi.

Determinarea activității glicozidazice.. Activitatea β-galactozidazică s-a determinat după Burton (9) ; mediul de reacție conținea 200 μmoli lactoză și extractul enzimatic în 5 ml tampon acid citric 0,1 M—Na_2HPo_4 0,2 M,pH 4,8. După 15 min de incubare la 60°C, probele au fost încălzite timp de 2 min în baie de apă la fierbere. La 0,5 ml din probele astfel tratate s-a adăugat 1 ml reactiv OPG (orto-dianisidină 0,01%, peroxidază 2000 U% și glucozoxidază 100 U%). După incubare 5 min la 30°C se stopează cu 2 ml H_2SO_4 10 N și se citește densitatea optică la 525 nm față de o probă martor, prelucrată în condiții similare, însă fără lactoză. Glucoza eliberată se stabilește printr-o curbă standard.

Activitatea β-galactozidazică este exprimată în unități, considerînd ca unitate cantitatea de enzimă care, în condițiile arătate, eliberează 1 μmol glucoză/ml/min/60°C.

Determinarea activității α-glucozidazice s-a făcut după Dalquest (10). La 0, 1 ml extract enzimatic diluat s-a adăugat 0,1 ml maltoză 2%. După 60 min de incubare la 37°C se adaugă 0,8 ml apă distilată, probele fiind încălzite apoi 2 min în baia de apă la fierbere. La 0,5 ml din probă s-au adăugat 3 ml reactiv OPG, preparat în TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,0 (pentru inhibarea maltazei prezente în unele preparate de glucozoxidază), și s-a incubat 60 min la 37°C. Apoi s-a determinat densitatea optică la 420 nm față de o probă martor fără maltoză. Unitatea α-glucozidazică este cantitatea de enzimă care, în condițiile de mai sus, conduce la 50 μg glucoză/ml/min.

Determinarea concentrației proteice. Concentrația proteică s-a determinat după Miller (11), folosind ca standard albumina serică bovină.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

A. niger și *A. orysae*, cultivate pe mediul Raulin și pe tărîțe de grîu, indică activitatea β-galactozidazică și α-glucozidazică; în schimb, *A.terreus* manifestă o slabă activitate pentru aceste două enzime (tabelele 1 și 2).

Tabela 1

Activitatea β-galactozidazică a tulpinilor de *Aspergillus*

Tulpina	Mediul Raulin (cultura)	μmol glucoză/ml/min			μmol glucoză/mg proteină		
		omog.	l. cult.	extract din cult. tărîțe	omog.	l. cult.	extract din cult. tărîțe
A. niger	statică	0,74	0	1,1	1,05	0	0,34
	agitată	0	0		0	0	
A. orysae	statică	0	0,74	1,5	0	1,3	0,42
	agitată	0,2	0		0,025	0	
A. terreus	statică	0	0	0,26	0	0	0,1
	agitată	0	0		0	0	

Condițiile de cultivare a tulpinilor de *Aspergillus* influențează în mare măsură activitatea enzimatică. În general, culturile obținute pe mediul cu tărîțe de grîu indică activități α- și β-glucozidazice mai bune decît cele obținute pe mediul sintetic Raulin; în aceste condiții, chiar

A. terreus, cultivat pe mediul cu tărîţe de grîu, arată o oarecare activitate glucozidazică, în special α-glucozidazică.

Culturile statice şi agitate obţinute pe mediul Raulin indică prezenţa β-galactozidazei în miceliul de *A. niger* şi absenţa ei în lichidele de cultură,

Tabela 2

Activitatea α-glicozidazică a tulpinilor de *Aspergillus*

Tulpina	Mediul Raulin (cultura)	μmol glucoză/ml/min			μmol glucoză/mg proteină		
		omog.	l.cult.	extract din cult. tărîţe	omog.	l. cult.	extract din cult. tărîţe
A. niger	statică	0	0	5,3	0	0	1,6
	agitată	0,69	0		1,4	0	
A. orysae	statică	0	0	4,8	0	0	1,3
	agitată	2,6	0		3,2	0	
A. terreus	statică	0	0	2,2	0	0	0,8
	agitată	0	0		0	0	

iar în cazul lui *A. orysae* absenţa enzimei în miceliu şi prezenţa ei în lichidul de cultură. Cu alte cuvinte, pentru *A. niger* β-galactozidaza este o enzimă intracelulară, fapt semnalat şi în literatură (12). Pentru *A. orysae* enzima este de natură extracelulară, rezultat identic cu cel stabilit de Park şi colab. (7) pentru β-galactozidaza din acelaşi fung.

În aceleaşi condiţii de lucru, α-glucozidaza se identifică în *A. niger* şi *A. orysae* numai în miceliul culturilor agitate obţinute pe mediul Raulin. Din acest punct de vedere, α-glucozidaza pare să fie de natură intracelulară.

Atît β-galactozidaza, cît şi α-glucozidaza din *A. niger* nu sînt însă puternic legate intracelular; ele se eliberează relativ uşor prin simplă agitare şi extracţie cu apă a culturilor obţinute pe mediul cu tărîţe de grîu (tabelele 1 şi 2).

În condiţii similare se eliberează cele două enzime şi în cazul lui *A. orysae* cultivat pe tărîţe de grîu. De fapt, în aceleaşi condiţii a fost extrasă β-galactozidaza din *A. orysae* de către Tanaka şi colab. (6) şi de Par k şi colab. (7).

În funcţie de vîrsta culturilor, după cum rezultă din tabela 3, activitatea β-galactozidazică şi α-glucozidazică din *A. niger*, exprimată în μmoli glucoză/mg proteină, este mai mare în culturile în vîrstă de 5 zile.

Suplimentarea mediilor de cultură cu diferite cantităţi de lactoză nu influenţează pozitiv producerea β-galactozidazei de către *A. niger*. După cum se vede din tabela 4, culturile de *A. niger* pe tărîţe de grîu cu

0,01 — 1 % lactoză indică o activitate β-galactozidazică mai mică faţă de cele obţinute în absenţa lactozei.

Tabela 3

Activitatea β-galactozidazică şi α-glicozidazică din *A. niger* cultivat pe tărîţe de grîu, în funcţie de virsta culturilor

Enzima	Virsta culturilor (zile)	μ moli glucoză/ml	μmoli glucoză/mg proteină
β-galactozidaza	3	1,7	0,23
	5	1,1	0,34
α-glucozidaza	3	8,2	1,1
	5	5,3	1,6

A. niger produce deci β-galactozidaza constitutiv, fără utilizarea lactozei ca inductor, la fel cum au arătat recent Park şi colab. (7) pentru aceeaşi enzimă din *A. orysae*.

Tabela 4

Activitatea β-galactozidazică din *A.niger*, cultivat 5 zile pe tărîţe de grîu suplimentate cu diferite cantităţi de lactoză

Lactoză (%)	μmol glucoză/ml	μmol glucoză/mg proteină
0	1,6	0,43
1	1,05	0,33
0,1	0,8	0,22
0,01	0,92	0,33

CONCLUZII

1. Dintre tulpinile de *Aspergillus* analizate, *A. niger* şi *A. orysae* produc β-galactozidază şi α-glucozidază.

2. Pentru *A. niger*, cele două enzime sînt intracelulare, iar pentru *A. orysae* α-glucozidaza este intracelulară şi β-galactozidaza extracelulară.

3. β-Galactozidaza şi α-glucozidaza se extrag relativ uşor prin agitare cu apă din culturile obţinute pe tărîţe de grîu.

4. *A. niger* produce β-galactozidaza constitutiv; suplimentarea mediilor cu tărîţe de grîu cu lactoză (0,01—1 %) are un efect negativ asupra producerii β-galactozidazei.

Pezentat la redacţie
la 15 decembrie 1979

* *Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti*
** *Universitatea din Galaţi, Facultatea T.C.P.A.T.P.*

LACTASE AND MALTASE ACTIVITY OF SEVERAL STRAINS OF *ASPERGILLUS*

SUMMARY

We investigated the activity of β-galactosidase and α-glucosidase in several strains of *Aspergillus* (*A. niger*, *A. orysae*, *A. terreus*).

A. niger and *A. orysae* grown on Raulin synthetic medium and on wheat bran showed β-galactosidase and α-glucosidase activity.

Both enzymes are intracellularly and constitutively produced by *A. niger*. *A. orysae* produced an intracellular α-glucosidase and an extracellular β-galactosidase.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Reed, *Enzymes in Food Processing*, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1975, p. 573.
2. J. Gryboski, *Gastrointestinal Problems in the Infant*, W. B. Saunders Comp., Philadelphia—London—Toronto, vol. XIII, 1975, p. 608—625.
3. *Lactase* 500 — *zur Behandlung der primären und sekundären Lactose— Intoleranz*, Fresenius, Bad Homburg.
4. P. Bahl, K. M. L. Agrawal, J. biol. Chem., **224**, 2970 (1969).
5. G. B. Borghum, M. Z. Sternberg, J. Food Sci., **37**, 619 (1972).
6. Y. Tanaka, A. Kagamushi, A. Kinchi, T. Horiuchi, J. Biochem., **77**, 241 (1975).
7. Y. K. Park, M. S. S. De Senti, G. M. Pastore, J. Food Sci., **44**, 100 (1979).
8. A. Jörgensen, *Mikroorganismen der Gärungsindustrie*, Verlag Hans Carol, Nürenberg, 1956, p. 522,
9. L. P. Burton, Annal. Biochem., **14**, 258 (1966).
10. A. Dalquest, Annal. Biochem., **7**, 18 (1964).
11. G. L. Miller, Annal. Chem., **31**, 964 (1959).
12. R. V. Fenicsova, A. S. Tikhomirova, A. N. Kulikova, V. D. Kuznetsov, Mikrobiologiya, **37**, 968 (1968).

PROPRIETĂŢILE AMILOGLUCOZIDAZEI LEGATE COVALENT DE AGAROZA ACTIVATĂ CU BrCN

HORST D. SCHELL, IRINA CORNOIU, MIHAI GÎRTAN

Rezumat. Se descriu metoda de obţinere şi proprietăţile mecanice, catalitice şi cinetice ale glucoamilazei imobilizate prin legarea ei covalentă de gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN. Preparatul enzimatic imobilizat prezintă o activitate reziduală de 33%. În comparaţie cu enzima liberă, glucoamilaza devine prin imobilizare mai rezistentă faţă de valori de pH situate deasupra pH-ului optim, faţă de temperaturi mai ridicate şi faţă de acţiunea inhibitorie a ionului Hg^{2+}. Prin imobilizare, valoarea constantei Michaelis (K_m aparentă) a glucoamilazei scade la o pătrime din valoarea enzimei libere. Gelul enzimatic prezintă proprietăţi mecanice şi catalitice foarte bune. Încărcat într-o coloană enzimatică, preparatul permite obţinerea unei viteze de curgere optime şi prezintă o activitate catalitică neschimbată şi după 6 zile de funcţionare continuă. La rece, preparatul glucoamilazei îşi păstrează activitatea catalitică practic nemodificată şi după 5 luni de la imobilizare.

Glucoamilaza sau amiloglucozidaza, cu denumirea sistemică de α-1,4-glucan-glucohidrolază (EC 3.2.1.3), hidrolizează legăturile α-1,4-glucozidice, dar şi pe cele α-1,6-glucozidice din polizaharide, eliberînd treptat unităţi de glucoză de la capătul nereducător al lanţului polizaharidic.

Glucoamilaza este o enzimă glicolitică importantă, cu reale şanse de aplicare în tehnică, mai ales în stare imobilizată, pentru obţinerea industrială a glucozei pe cale enzimatică din amidon.

În lucrarea de faţă se prezintă modul de obţinere şi proprietăţile catalitice şi cinetice ale glucoamilazei libere şi imobilizate. S-a studiat totodată şi comportarea enzimei imobilizate, în comparaţie cu cea liberă, faţă de acţiunea ionului Hg^{2+}, un metal greu cu acţiune inhibitorie asupra enzimelor, plecînd de la constatări anterioare (1) că enzimele devin prin imobilizare mai puţin sensibile la acţiunea inhibitorilor lor. Drept suport insolubil pentru imobilizare s-a folosit un gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN, elaborat în laboratorul nostru. Prin acest procedeu, enzima se leagă covalent de suportul insolubil şi nu se mai desprinde de acesta nici la modificări mai drastice ale mediului de reacţie (variaţii de pH sau ale concentraţiilor ionice).

În literatura de specialitate s-au descris cîteva preparate de glucoamilază imobilizată, care au fost obţinute însă mai ales prin legarea covalentă sau ionică a enzimei de derivaţi ai celulozei (2)—(7). S-au descris de asemenea şi preparate imobilizate prin legarea acestei enzime pe membrane de colagen (8), hexil-Sepharose (9) sau chiar pe perle de sticlă poroasă (10).

MATERIAL ŞI METODE

Activarea agarozei şi cuplarea glucoamilazei. S-au activat 30 ml gel perlat de agaroză reticulată folosind 0,5 g BrCN (Merck-Schuchardt) dizolvat în 25 ml apă distilată şi agitînd electromagnetic amestecul de reacţie timp de 8 min, la pH în jur de 10,0. Peste agaroza activată şi spălată cu 1 l apă distilată răcită cu gheaţă şi 1 l soluţie $NaHCO_3$ 0,1 M, de asemenea răcită cu gheaţă, s-au adăugat apoi 15 mg glucoamilază dizolvată în 15 ml soluţie de bicarbonat 0,1 N ; s-a lăsat amestecul de reacţie să stea peste noapte la temperatura camerei. A doua zi s-a spălat produsul de cuplare consecutiv cu apă distilată şi cu o soluţie de NaCl 0,5 M pînă la îndepărtarea completă a enzimei neimobilizate, iar gelul enzimatic s-a păstrat suspendat în apă distilată pînă la folosire, la 3—4°C.

Determinarea cantităţii de glucoamilază legată de suportul insolubil s-a efectuat prin dozarea spectrofotometrică a enzimei rămase nelegată din amestecul de reacţie.

Determinarea activităţii enzimatice a glucoamilazei libere şi legate s-a realizat prin metoda indicată de Noelting şi Bernfeld (11), bazată pe determinarea fotocolorimetrică a glucozei formate prin acţiunea hidrolitică a enzimei timp de 30 min la 37°C asupra amidonului, folosind un grafic de etalonare construit cu concentraţii de la 0,1 la 3 mg glucoză/ml şi exprimînd activităţile enzimatice în μmoli glucoză/min/mg proteină la 37°C. În mediul de incubare s-a folosit 1 ml soluţie de glucoamilază 0,001% în cazul enzimei libere şi 0,05 ml gel depus în cazul enzimei imobilizate. La enzima insolubilizată, spre deosebire de enzima liberă, stoparea reacţiei enzimatice s-a efectuat prin îndepărtarea gelului enzimatic prin filtrare. Filtratul obţinut s-a utilizat apoi pentru determinarea cantităţii glucozei formate, iar enzima insolubilizată de pe pînia de filtrare a fost folosită la o nouă reacţie enzimatică, după o prealabilă spălare cu tampon acetat.

Determinarea influenţei pH-ului asupra enzimei libere şi legate de suportul insolubil s-a efectuat realizînd următoarele valori de pH în mediul de reacţie : 2, 4, 6 şi 8.

Determinarea termostabilităţii enzimei libere şi imobilizate s-a făcut incubînd enzimele înaintea reacţiei enzimatice timp de 60 min la următoarele temperaturi : 25, 40, 55, 65 şi 75°C. După incubare s-a efectuat reacţia enzimatică în mod obişnuit la 37°C, timp de 30 min.

Determinarea activităţii catalitice a enzimei libere şi legate în funcţie de temperatura mediului de reacţie s-a efectuat lucrînd la următoarele temperaturi : 25, 37, 45, 60, 75 şi 90°C.

Determinarea activităţii catalitice în funcţie de concentraţia enzimei s-a făcut folosind în mediul de reacţie cantităţi de 2, 4, 6, 8 şi 10 μg enzimă liberă şi de 5, 10, 15, 20 şi 25 μg enzimă legată.

Determinarea activităţii catalitice a enzimei libere şi imobilizate în funcţie de concentraţia de substrat. S-au folosit 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 şi 1 ml amidon 0,5% în mediul de reacţie, ceea ce corespunde la concentraţii de 1, 2, 3, 4 şi 5 mg amidon/probă atît pentru enzima liberă, cît şi pentru cea imobilizată. Reprezentînd grafic valorile reciproce ale vitezei de reacţie în funcţie de reciprocele concentraţiilor de substrat (metoda grafică a lui Lineweaver-Burk), s-au determinat constantele Michaelis pentru cele două preparate ale enzimei.

Determinarea influenţei ionului de Hg^{2+} asupra activităţii glucoamilazei libere şi imobilizate. S-a determinat activitatea enzimatică a celor două preparate ale enzimei folosindu-se două concentraţii diferite de substrat (soluţie de amidon 0,5 şi 1%) la diferite concentraţii de clorură mercurică (pentru fiecare din cele două concentraţii de substrat). Concentraţiile de clorură mercurică pentru enzima liberă au fost cuprinse între 0,6 şi 15 mM, iar pentru enzima imobilizată între 2,5 şi 25 mM clorură mercurică, dizolvată în tampon acetat pH 4,5. Pentru determinarea constantei de inhibiţie s-a folosit metoda grafică reprezentînd reciprocele vitezei de reacţie în funcţie de concentraţia de clorură mercurică.

În sfîrşit, s-a determinat şi comportarea enzimei imobilizate la un sistem de hidroliză continuă într-o coloană cromatografică de 1 × 10 cm, recoltînd probe de cîte 3 ml din 2 în 2 ore.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Preparatul enzimatic insolubil obţinut prin legarea covalentă a glucoamilazei de agaroză reticulată şi activată cu BrCN posedă o activitate specifică reziduală de 33 % şi un conţinut proteic de 0,1 mg proteină/ml gel. Activitatea reziduală se încadrează în valorile indicate în literatura de specialitate şi obţinute pe alte suporturi şi prin alte metode de imobilizare, valori care sînt cuprinse între 17 şi 55 % (2) — (10).

Studiindu-se influenţa pH-ului asupra activităţii catalitice a enzimei libere şi legate, se constată că, în urma imobilizării, enzima îşi deplasează

pH-ul optim de acțiune cu o jumătate de unitate spre domeniul alcalin, și anume de la valoarea 4,5 la 5. Această deplasare a pH-ului optim de acțiune în cazul enzimelor imobilizate se întîlnește relativ des și este determinată de natura matricei suportului. Se constată totodată o sensibilitate mai scăzută la valori de pH mai mari la enzima legată față de enzima liberă (fig. 1). Astfel, în timp ce la pH 5,5 enzima legată mai prezintă încă o activitate de 90 % din cea inițială, enzima liberă prezintă

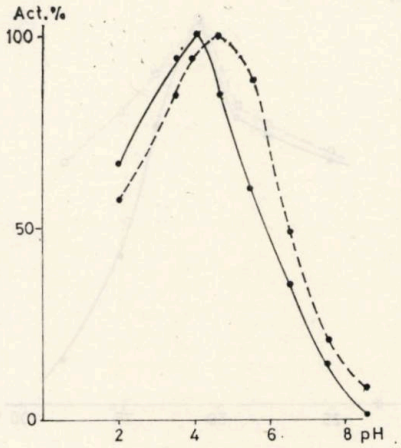


Fig. 1. — Variația activității enzimatice a glucoamilazei libere (—) și legate (- - -) în funcție de pH.

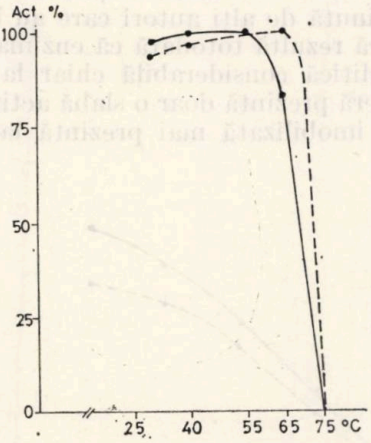


Fig. 2. — Influența temperaturii de preincubare asupra glucoamilazei libere (—) și legate (- - -).

în aceste condiții doar 60 % din această activitate. Ambele enzime își pierd practic activitatea enzimatică la un pH mai mare de 8,0.

În ceea ce privește termostabilitatea celor două forme de enzimă, în urma imobilizării se constată o rezistență mai mare față de acțiunea denaturantă a temperaturii (fig. 2).

Rezistența mai mare a enzimei imobilizate față de acțiunea temperaturii s-ar explica prin acțiunea de stabilizare a moleculei proteice ca urmare a legării ei covalente de suportul insolubil. Acest fapt a fost observat și de Brillouet și colab. (8) în cazul glucoamilazei imobilizate pe pelicule de

colagen. La enzima liberă se observă, începînd cu temperatura de preincubare de 55°C, o scădere bruscă a activităţii catalitice, în timp ce enzima legată prezintă o activitate maximă chiar la 65°C. La ambele enzime se observă, în urma preincubării la temperaturi cuprinse între 40 şi 55°C, o anumită activare a activităţii catalitice.

În ceea ce priveşte influenţa temperaturii mediului de reacţie asupra activităţii catalitice a celor două forme de enzimă, se constată, după

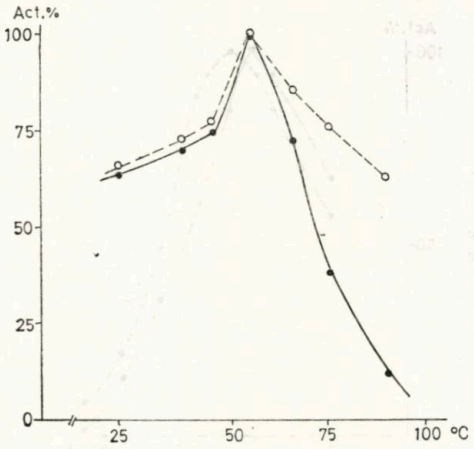


Fig. 3. — Influenţa temperaturii de reacţie asupra activităţii glucoamilazei libere (——) şi legate (- - -).

cum rezultă din figura 3, că ambele forme de enzimă prezintă o temperatură optimă de reacţie situată la 55°C. Valoarea obţinută de noi este în deplină concordanţă cu cea obţinută de alţi autori care au lucrat pe aceeaşi enzimă (8). Din această figură rezultă totodată că enzima imobilizată îşi păstrează o activitate catalitică considerabilă chiar la temperaturi mai ridicate, la care enzima liberă prezintă doar o slabă activitate amilolitică. Astfel, în timp ce enzima imobilizată mai prezintă la 75°C

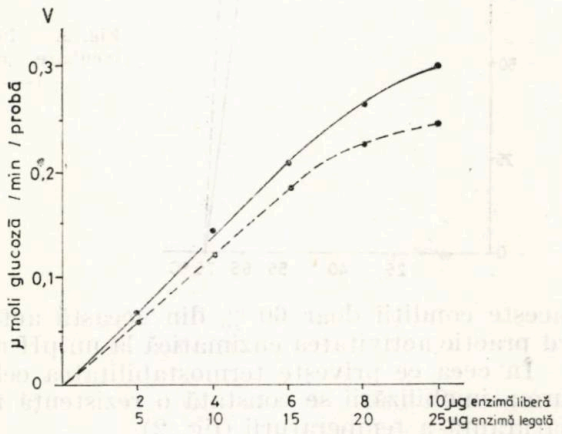


Fig. 4. — Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de concentraţia de enzimă iberă (——) şi legată (- - -).

o activitate de 75%, cea liberă păstrează la această temperatură doar o activitate de 33% faţă de cea iniţială.

În figura 4 sînt redate variaţiile activităţii catalitice a enzimei libere şi legate în funcţie de concentraţia de enzimă. Variaţia activităţi

este liniară pentru ambele enzime la concentrații mai mici, prezentînd apoi, la valori mai mari, o tendință de aplatisare. Această comportare este obișnuită pentru enzime care acționează asupra substratelor macromoleculare.

În figurile 5 și 6 sînt redate rezultatele obținute în studiul influenței concentrațiilor de substrat asupra activității catalitice a enzimei libere și a celei legate, precum și reprezentarea grafică a reciprocelor valorilor

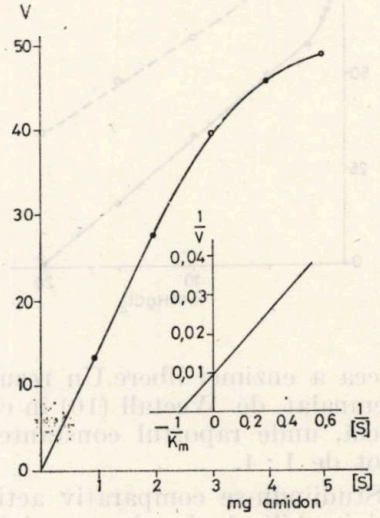


Fig. 5. — Influența concentrației de substrat asupra activității specifice a enzimei libere și reprezentarea valorilor, după Lineweaver-Burk.

găsite pentru vitezele de reacție în funcție de reciprocele concentrațiilor de substrat.

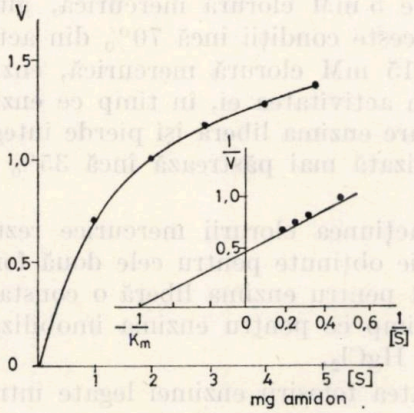


Fig. 6. — Influența concentrației de substrat asupra activității specifice a enzimei legate și reprezentarea valorilor, după Lineweaver-Burk.

Pentru enzima liberă se constată o constantă Michaelis de 6,2 g amidon/l, iar pentru enzima legată de 1,7 g amidon/l. Aceste valori sînt în concordanță privind ordinul lor de mărime cu valori indicate în literatura de specialitate, și anume de 1,5 g amidon/l la enzima liberă și de

7,7 g amidon/l la enzima legată (8). Spre deosebire de acești autori, noi am găsit pentru enzima legată o valoare de aproximativ 4 ori mai mică

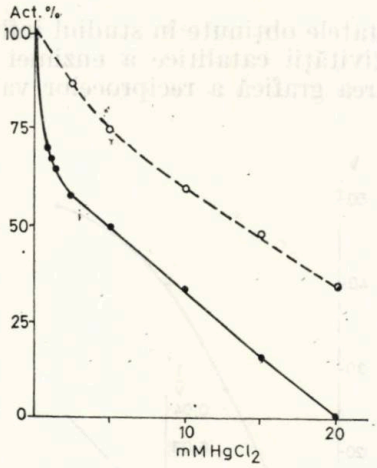


Fig. 7. — Influența concentrației HgCl asupra activității catalitice a enzime libere (—) și legate (- - -).

decît cea a enzimei libere.Un rezultat similar cu cel constatat de noi a fost semnalat de Weetall (10) în cazul glucoamilazei imobilizate pe perle de sticlă, unde raportul constantei Michaelis a enzimei libere și legate este tot de 1 : 4.

Studiindu-se comparativ activitatea amilolitică a glucoamilazei libere și imobilizate în absența și în prezența diferitelor concentrații de clorură mercurică, se observă și de data aceasta o rezistență mai mare în cazul enzimei legate față de inhibitorul folosit, în comparație cu enzima liberă (fig. 7). Astfel, în timp ce enzima liberă își pierde 50% din activitatea ei inițială la o concentrație de 5 mM clorură mercurică, glucoamilaza imobilizată își păstrează în aceste condiții încă 70% din activitatea inițială. La o concentrație de 15 mM clorură mercurică, enzima imobilizată își mai păstrează 60% din activitatea ei, în timp ce enzima liberă doar 35%. La concentrații la care enzima liberă își pierde integral activitatea amilolitică, enzima imobilizată mai păstrează încă 35% din activitatea inițială.

Stabilitatea crescută față de acțiunea clorurii mercurice rezultă și din valorile constantelor de inhibiție obținute pentru cele două forme ale enzimei (fig. 8). Astfel s-a obținut pentru enzima liberă o constantă de inhibiție $K_i = 10$ mM $HgCl_2$, în timp ce pentru enzima imobilizată această valoare este situată la 7 mM $HgCl_2$.

Încercările de a vedea posibilitatea folosirii enzimei legate într-un sistem de transformare continuă a amidonului în glucoză au arătat că enzima legată încărcată într-o coloană cromatografică prezintă aceeași activitate și după 6 zile de funcționare continuă. Determinările efectuate din 2 în 2 ore au dovedit o conversie de 100% a amidonului în glucoză la o viteză de curgere de 25—30 ml/oră.

Produsul de glucoamilază imobilizată realizat de noi și-a păstrat practic activitatea catalitică nemodificată și după 5 luni de la preparare.

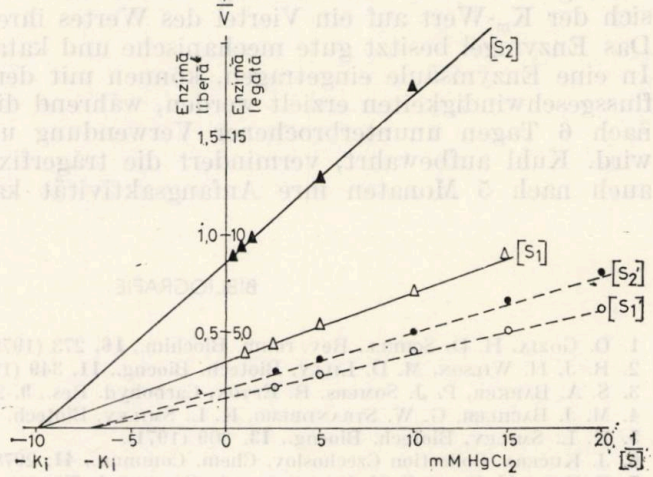


Fig. 8. — Determinarea constantei de inhibiție a $HgCl_2$ pentru enzima liberă (——) și legată (- - -).
S_1 — soluții de amidon 0,5%
S_2 — soluții de amidon 2%

CONCLUZII

1. Glucoamilaza imobilizată prin legarea covalentă de agaroza reticulată și activată cu BrCN prezintă o activitate reziduală de 33%.
2. Glucoamilaza imobilizată este mai puțin sensibilă la variații de pH, temperatură și la influența inhibitorie a ionilor de Hg^{2+}.
3. Prin imobilizare, glucoamilaza își micșorează constanta Michaelis.
4. Prin folosirea glucoamilazei imobilizate într-un sistem de hidroliză continuă în coloană cromatografică, activitatea enzimatică rămîne neschimbată și după 6 zile de funcționare, producînd o conversie de 100% a amidonului în glucoză.
5. Gelul enzimatic își menține activitatea catalitică practic nemodificată și după 5 luni de păstrare la rece.

Prezentat la redacție
la 17 decembrie 1979

Institutul de științe biologice, București,
Laboratorul de enzimologie și biostimulatori

HERSTELLUNG UND EIGENSCHAFTEN DER AN BrCN-AKTIVIERTE AGAROSE KOVALENT GEBUNDENEN AMYLOGLUKOSIDASE

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden die Herstellungsmethode sowie die mechanischen, katalytischen und kinetischen Eigenschaften der an perlförmiges Gel BrCN-aktivierter vernetzter Agarose kovalent gebundenen Amyloglukosidase gegeben. Die Restaktivität des unlöslichen Enzympräparates beträgt

33%. Im Vergliech zum ungebundenen Enzym, weist die trägerfixierte Amyloglukosidase gegenüber basischen pH-Werten, höheren Temperatoren und der hemmenden Wirkung von Hg^{2+}-Ionen eine grössere Beständigkeit auf. Durch Bindung an den unlöslichen Träger vermindert sich der K_m-Wert auf ein Viertel des Wertes ihrer ungebundenen Form. Das Enzymgel besitzt gute mechanische und katalytische Eigenschaften. In eine Enzymsäule eingetragen, können mit dem Gel optimale Durchflussgeschwindigkeiten erzielt werden, während die Enzymaktivität auch nach 6 Tagen ununterbrochener Verwendung unverändert beibehalten wird. Kühl aufbewahrt, vermindert die trägerfixierte Amyloglukosidase auch nach 5 Monaten ihre Anfangsaktivität kaum.

BIBLIOGRAFIE

1. O. Gozia, H. D. Schell, Rev. roum. Biochim., **16**, 273 (1979).
2. R. J. H. Wilson, M. D. Lilly, Biotech. Bioeng., **11**, 349 (1969).
3. S. A. Barker, P. J. Somers, R. Epton, Carbohyd. Res., **9**, 257 (1969).
4. M. J. Bachler, G. W. Strandberg, K. L. Smiley, Biotech. Bioeng., **12**, 85 (1970).
5. K. L. Smiley, Biotech. Bioeng., **13**, 309 (1971).
6. J. Kučera, Collection Czechoslov. Chem. Commun., **41**, 2978 (1976).
7. P. Roth, U. Feist, C. H. Flemmings, A. Gabert, A. Täufel, Acta biol. med. germ., **36**, 179 (1977).
8. J.-M. Brillouet, P. R. Coulet, D. C. Gautheron, Biotech. Bioeng., **19**, 125 (1977).
9. K. D. Cardwell, R. Axén, M. Bergwall, J. Porath, Biotech. Bioeng., **18**, 1589 (1976).
10. H. H. Weetall, Chemiker-Zeitung, **97**, 611 (1973).
11. G. Noelting, P. Bernfeld, Helv. chim. Acta, **31**, 286 (1948).

CERCETĂRI EXPERIMENTALE ASUPRA FOTOOXIDĂRII BILIRUBINEI *IN VITRO*

GR. TURCU, MARIANA CONSTANTINESCU

Rezumat. S-a studiat mecanismul fotooxidării bilirubinei *in vitro*. Utilizîndu-se ca fotosensibilizator albastrul de metilen, iar ca inhibitor β-carotenul, din cinetica fotooxidării bilirubinei s-au tras concluzii asupra participării oxigenului în stare singlet ($^1O_2$) în procesul de autooxidare a pigmentului biliar. Experienţele privind fotooxidarea bilirubinei la diferite pH-uri au arătat că fotodegradarea este maximă la pH cuprins între 7,05 şi 7,45, deci în jurul pH-ului fiziologic. Datele obţinute din aceste ultime experienţe ridică din nou problema oportunităţii utilizării fototerapiei pentru tratarea icterului fiziologic la nou-născuţi.

Cu toate că nu se cunoşteau nici mecanismul fotooxidării bilirubinei, nici fotoprodusii rezultaţi, fototerapia era folosită intens pentru reducerea hiperbilirubinemiei nou-născuţilor (1). De-abia în ultimul deceniu s-au efectuat studii mai aprofundate asupra mecanismului fotooxidării bilirubinei (2), (3) şi asupra identificării fotoprodusilor rezultaţi (4), (5). De asemenea s-au întreprins cercetări asupra efectului fotodinamic al bilirubinei privind inactivarea unor enzime din membranele eritrocitare (6).

Lucrarea de faţă a fost efectuată pe linia acestor ultime cercetări. Am urmărit atît clarificarea mecanismului fotooxidării bilirubinei, cît şi intensitatea fotooxidării pigmentului la diferite pH-uri, vizînd îndeosebi pH-ul fiziologic.

MATERIALE ŞI METODE

Bilirubina utilizată a fost chimic pură şi provenea de la firma PREZEPAKOWANO-GLIWICE. Albastrul de metilen şi β-carotenul erau de la firma MERCK, iar cloroformul şi fosfaţii proveneau de la Reactivul Bucureşti. Iluminarea probelor s-a făcut cu o lampă cu mercur HBO de 200W. S-a utilizat un filtru albastru BG-12. Timpii de iluminare se obţin prin cumularea timpilor din expunerile anterioare. Scăderea absorbţiei bilirubinei a fost urmărită trasînd după fiecare iluminare spectrul de absorbţie între 350 şi 700 nm cu spectrofotometrul SPECORD UV—VIS.

REZULTATE

O serie de experienţe s-au efectuat pe soluţii de bilirubină în cloroform ($1{,}25 \times 10^{-5}$ M). Soluţia pusă în cuva de cuarţ a spectrofotometrului a fost barbotată 5 min cu oxigen ; apoi s-au trasat spectrele de absorbţie

după diferiţi timpi de expunere la lumina lămpii cu mercur. Spectrele obţinute sînt redate în figura 1.

S-au repetat experienţele anterioare în aceleaşi condiţii, adăugînd însă în soluţia de bilirubină în cloroform fie albastru de metilen

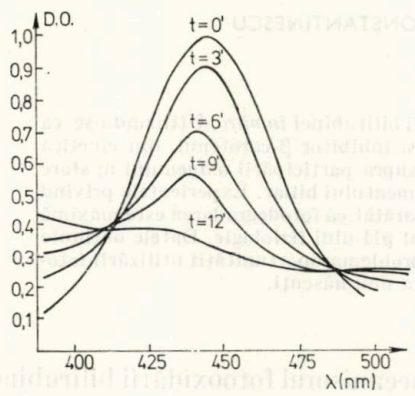


Fig. 1. — Evoluţia în timp a spectrului de absorbţie al bilirubinei ($1{,}25 \times 10^{-5}$M).

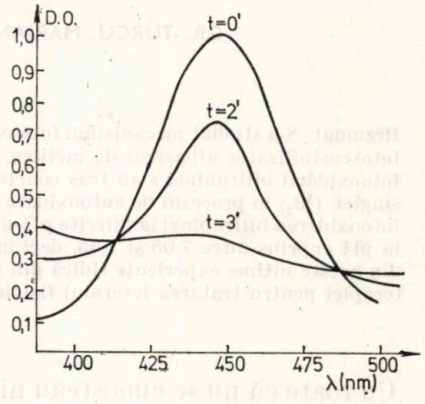


Fig. 2. — Evoluţia în timp a spectrului de absorbţie al bilirubinei ($1{,}25 \times 10^{-5}$M) cu albastru de metilen ($1{,}25 \times 10^{-6}$M).

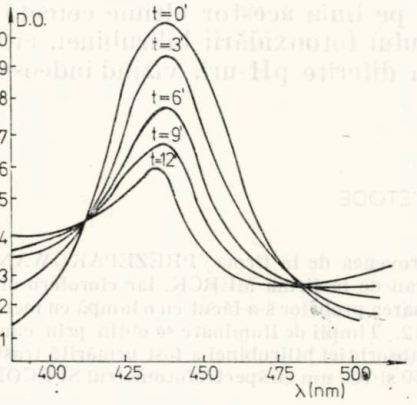


Fig. 3. — Evoluţia în timp a spectrului de absorbţie al bilirubinei ($1{,}25 \times 10^{-5}$ M) cu β-caroten (1×10^{-5} M).

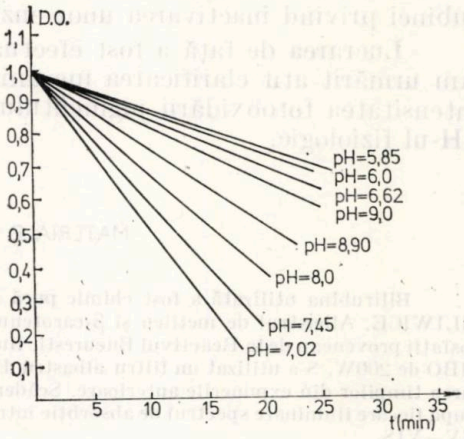


Fig. 4. — Variaţia densităţii optice la 450 nm a bilirubinei în funcţie de pH-ul mediului.

($1{,}25 \times 10^{-6}$ M), fie β-caroten (1×10^{-5}). Spectrele obţinute pe probele cu albastru de metilen sînt redate în figura 2, iar cele obţinute pe probele cu β-caroten în figura 3.

În figura 4 sînt date spectrele realizate pe bilirubină aflată în soluţii tampon fosfat cu pH-uri variind între 5,8 şi 9.

DISCUȚII

Figurile 1, 2 și 3 susțin schema propusă de Land privind intervenția oxigenului singlet în fotodegradarea bilirubinei. După Land (3), fotooxidarea bilirubinei ar avea loc în patru etape :

$$\text{Bilirubină} \longrightarrow {}^1\text{Bilirubină}^*$$

$${}^1\text{Bilirubină}^* \xrightarrow{\text{ISC}} {}^3\text{Bilirubină}^*$$

$${}^3\text{Bilirubină}^* + {}^3O_2 \longrightarrow \text{Bilirubină} + {}^1O_2$$

$$\text{Bilirubină} + {}^1O_2 \longrightarrow \text{Produși}$$

Așa cum reiese din cele trei figuri obținute de noi experimental, ca și din figura 5, prezența unui fotosensibilizator care favorizează formarea de oxigen $^1O_2$ (albastrul de metilen) accelerează fotodegradarea. În comparație cu martorul (fig. 1), la care bilirubina s-a degradat după 12 min, în proba cu albastru de metilen (fig. 2) aceasta s-a degradat după 3 min. Prezența unui inhibitor al formării oxigenului $^1O_2$, cum este β-carotenul, încetinește fotodegradarea. (După 12 min mai există în probă bilirubină nedegradată, care absoarbe la 450 nm, vezi fig. 3.) Aceste afirmații reies și mai clar din figura 5, unde pantele dreptelor care reprezintă cinetica fotodegradării bilirubinei sînt diferite, și anume panta cea mai mare se observă la proba cu albastru de metilen (fotosensibilizator al formării oxigenului $^1O_2$), în timp ce panta cea mai mică apare la proba ce conține β-caroten (inhibitor al formării oxigenului $^1O_2$). De altfel, schema fotodegradării bilirubinei *in vitro* susținută de datele noastre experimentale este în acord cu rezultatele din literatură (3), care arată că energia stării

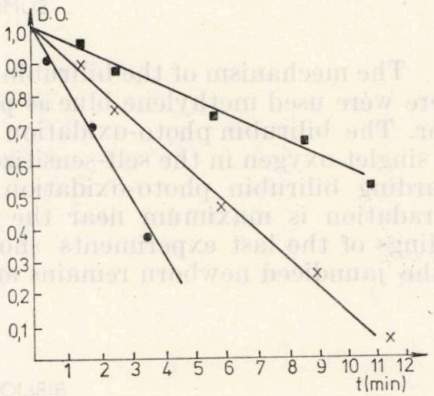


Fig. 5. — Variația densității optice la 450 nm a soluției de bilirubină (× — ×), bilirubină cu albastru de metilen(● — ●) și bilirubină cu β-caroten (■ — ■).

excitate de triplet a bilirubinei (150 kJ/mol) este deasupra energiei stării excitate de singlet a oxigenului (94 kJ/mol). Potrivit schemei de nivele de energie prezentate, este plauzibil faptul că procesul de degradare a bilirubinei implică starea excitată de triplet a bilirubinei și cea de singlet a oxigenului.

Studiind figura 4, se deduce faptul că fotodegradarea bilirubinei are loc cel mai intens în jurul pH-ului fiziologic (7,05 — 7,45). Deci, la acest pH apar cel mai rapid fotoprodușii de degradare ai pigmentului, dar acești produși, așa cum rezultă din lucrările lui Bonnett și colab. (4), sînt toxici. De asemenea, din cercetările lui Girotti (6) reiese că bilirubina inhibă activitatea unor enzime legate de membrana eritrocitară. Cum fotodegradarea bilirubinei este maximă la pH fiziologic, nu este exclus ca aceasta să acționeze și asupra altor biocatalizatori, ceea ce s-ar repercuta negativ asupra dezvoltării nou-născutului. La aceasta ar contribui și produșii de degradare. Din acest motiv, datele obținute de noi, alături de cele existente în literatură, pledează pentru o fundamentare științifică a utilizării fototerapiei.

CONCLUZII

1. Rezultatele obținute prin utilizarea sensibilizatorilor sau inhibitorilor formării oxigenului singlet susțin schema propusă de Land privind intervenția $^1O_2$ în fotodegradarea bilirubinei.

2. Fotodegradarea bilirubinei este cea mai intensă la pH fiziologic, adică exact la pH-ul optim al majorității enzimelor celulare.

Prezentat la redacție
la 20 iulie 1979

Universitatea București
Facultatea de fizică

EXPERIMENTAL ON THE PHOTO-OXIDATION OF BILIRUBIN *IN VITRO*

SUMMARY

The mechanism of the bilirubin photo-oxidation *in vitro* was studied. There were used methylene blue as photosensitizer and β-carotene as inhibitor. The bilirubin photo-oxidation kinetics reveals the participation of the singlet oxygen in the self-sensitized bilirubin process. The experiments regarding bilirubin photo-oxidation at different pH prove that photodegradation is maximum near the physiological pH (7.05 — 7.45). The findings of the last experiments show us again that the phototherapy of the jaundiced newborn remains an open problem.

BIBLIOGRAFIE

1. R. J. Cremer, P. W. Perryman, D. H. Richards, Lancet, **1**, 1094 (1958).
2. A. F. McDonagh, Biochem. Biophys. Res. Commun., **44**, 1306 (1971).
3. L. J. Land, Photoch. Photobiol., **24**, 475 (1976).
4. R. Bonnett, M. Stewart, J. chem. Soc. Perkin I, 224 (1975).
5. W. F. Kurtin, Photoch. Photobiol., **27**, 5 (1978).
6. A. W. Girotti, Photoch. Photobiol., **24**, 525 (1976).

REFERAT GENERAL

FUNCŢIA PĂRŢII GLUCIDICE A IMUNOGLOBULINELOR

CECILIA MOTAŞ

I. COMPONENTA GLUCIDICĂ A IMUNOGLOBULINELOR

a. Tipul de legătură cu proteina
b. Structura unităţilor oligozaharidice
c. Sinteza unităţilor oligozaharidice
d. Aşezarea unităţilor oligozaharidice de-a lungul lanţurilor H

II. ROLUL COMPONENTEI GLUCIDICE A IMUNOGLOBULINELOR

a. Rol în stabilizarea moleculelor de imunoglobuline şi de izolare a domeniilor
b. Rol în transportul transplacentar al imunoglobulinelor
c. Rol în secreţia şi în polimerizarea imunoglobulinelor
d. Rol în reglarea timpului de înjumătăţire a imunoglobulinelor circulante
   1. Rolul fragmentului Fc
   2. Rolul domeniului C_H2
   3. Rolul acidului sialic
   4. Rolul componentei centrale (al „miezului") din complexele glucidice
e. Rol în proprietăţile biologice ale imunoglobulinelor

III. ENZIME GLICOZIDAZICE CA AGENŢI DE SCINDARE A LANŢURILOR GLUCIDICE

Endo-β-N-acetilglucozaminidaza H
Endo-β-N-acetilglucozaminidaza D
Endo-β-N-acetilglucozaminidaza L

I. COMPONENTA GLUCIDICĂ A IMUNOGLOBULINELOR

Toate imunoglobulinele conţin glucide în cantităţi specifice clasei lor. Iniţial s-au stabilit tipurile de glucide care intră în structura lanţurilor glucidice ale imunoglobulinelor. S-a constatat că practic toate au prezente N-acetilglucozamină, galactoză, manoză, fucoză şi acid sialic şi că proteinele mielomatoase din clasa IgA_1 (1) şi IgD (2) conţin în plus o cantitate apreciabilă de N-acetilgalactozamină, variind pentru IgA_1 între 12,8%

(3) și 1,4 % (4). S-a mai arătat că există variații individuale în cadrul acelorași clase, dar trebuie să se aibă în vedere că determinările s-au făcut pe imunoglobuline mielom.

Etapa următoare a stabilit secvența resturilor glucidice în structura lanțurilor oligozaharidice din fiecare clasă. Această cercetare, prin complexitatea ei, s-a făcut în mai multe centre, întinzîndu-se pe mai mulți ani, iar primele rezultate au fost sintetizate de Clamp și Johnson (2). O sinteză a rezultatelor a fost realizată și în cadrul laboratorului nostru (5).

Aceste rezultate se referă la imunoglobulinele umane.

a. Tipul de legătură cu proteina

Ceea ce este comun la toate clasele de imunoglobuline este legătura covalentă dintre aminoacidul lanțului H și primul glucid al lanțului oligozaharidic, care este de predilecție N-acetilglucozamina sau cîteodată N-acetilgalactozamina. Se stabilește astfel o legătură N-glicozidică între gruparea aminică a asparaginei și oxidrilul semiacetalic al glucozaminei sau galactozaminei sau o legătură O-glicozidică de tip mucină între oxidrilul treoninei sau serinei și oxidrilul semiacetalic al acetilgalactozaminei (2).

Bazat pe examinarea secvenței aminoacizilor la numeroase glicoproteine, Marshall (6) arată că secvența tripeptidică acceptoare a oligozaharidului Asn-X-Ser/Thr (unde X poate fi orice aminoacid) este o condiție necesară, dar nu suficientă pentru atașarea celor mai multe oligozaharide legate N-glicozidic la proteine. Variațiile în gradul de glicozidare și în localizarea glicozidării pot fi puse pe seama unei serii de factori, cum sînt prezența și specificitatea transferazelor adecvate, compartimentarea subcelulară sau restricțiile impuse de plierea polipeptidică.

b. Structura unităților oligozaharidice

În cadrul legăturii de tip N-glicozidic, s-au desprins două feluri de lanțuri oligozaharidice : unele de tip complex, cu variații la capetele terminale (7), și unul de tip „high mannose", specific IgM (8) și IgE (9), (10), care prezintă și el variații în numărul și în poziția resturilor de manoză (7).

În figurile 1, *a* și *b* sînt redate, după Baenziger și Kornfeld (11), tipurile de structuri, repartizate pe clase de imunoglobuline.

Unitatea „high mannose", propusă de Baenziger (11), corespunde unităților oligozaharidice simple de tip C_B, propuse de Clamp și Johnson (2), iar unitățile complexe (11) corespund unităților oligozaharidice complexe de tip C_A (2).

O sinteză a cel puțin zece lucrări publicate între 1971 și 1976, sinteză care completează și numărul aminoacidului din structura primară a imunoglobulinelor la care este atașat oligozaharidul, este prezentată de Winkelhake (12) (fig. 2).

Clasa B de oligozaharide se găsește predominant spre capătul C-terminal (domeniile C_H3 și C_H4) al lanțurilor H, pe cînd structurile complexe se găsesc mai adesea spre domeniul C_H2. Ca exemplificare redăm tabela 1 (12).

Deoarece lanțul „high mannose" al IgM de la aminoacidul 563 și lanțul complex al IgA de la aminoacidul 459 sînt localizate atît de aproape de cisteina de la capătul C-terminal, care este implicată în prinderea a cel puțin unui lanț greu din IgA sau IgM la lanțul J (13), (14), (14 b), a fost tentant să se presupună că trebuie să aibă un rol în prevenirea formării de hibrizi de monomeri IgA sau IgM cînd sînt asamblați cu lanțul J (15).

Din rezultatele lui Baenziger și Kornfeld (7), (11) s-au desprins cîteva aspecte deosebite, care merită să fie citate. Astfel, structurile oligozaharidelor localizate pe asparagina omologă din diferite clase de imunoglobuline nu sînt și ele omologe.

Tipul complex de oligozaharid legat N-glicozidic se găsește pe toate tipurile de proteine mielom. El are structură foarte asemănătoare între clasele de mielom, însă prezintă și importante diferențe, care rezidă în prezența sau absența fucozei în „miez", în prezența sau absența unui al treilea rest terminal nereducător, care este o N-acetilglucozamină legată la manoza din miez, și în numărul de resturi de galactoză și de acid sialic prezent. Diferențele nu trebuie neapărat să reflecte o microheterogenicitate în sensul unei necompletări, ci pot reprezenta glicopeptide provenite din diferiți loci de-a lungul lanțurilor grele respective (10).

S-a stabilit structura primară a regiunii balama a IgA_1 (16) odată cu localizarea legăturii O-glicozidice a glicopeptidelor specifice acestei regiuni a IgA_1 (11), (16). În figura 3 este dată această structură, cu totul deosebită și foarte simetrică, formată din două porțiuni identice de cîte 7—8 resturi de aminoacizi și foarte bogată în prolină.

S-a demonstrat că structura lanțurilor oligozaharidice este cu totul deosebită de a celor legate N-glicozidic (11), (16), (17) și că, la rîndul lor, și ele sînt așezate foarte simetric în regiunea balama, cu excepția celei legate de serina N-terminală a lanțului.

Mai este de semnalat absența acestei secvențe simetrice din regiunea balama a moleculelor de IgA_2, odată cu absența lanțurilor oligozaharidice O-glicozidice.

c. Sinteza unităților oligozaharidice

Formarea glicoproteinelor N-glicozidice are loc prin transferul unei părți oligozaharidice preformate de la „intermediarul lipidic" la proteina nascentă.

Primul pas în glicozilarea unei proteine este deci transferul lanțului $GlcNAc_2Man_9Glc_3$ de la dolichol-pirofosfat (Dol—PP) la proteină (18), (19). Acest oligozaharid „high mannose" este asamblat pe Dol—PP prin adăugarea treptată a resturilor glucidice, care vin fie de la glucid-nucleotid, fie de la glucidele legate de Dol—PP (20).

Miezul glicoproteic are o secvență liniară pînă la prima manoză legată 1,4 la chitibioză (două GlcNAc legate β 1,4), apoi devine ramificat. Studierea mai multor glicoproteine a arătat ramificări adiționale în regiunea „high mannose" (21) (vezi fig. 2).

Descoperirea că oligozaharidele complexe ale IgG, IgA_1, IgM și IgE, precum și oligozaharidul „high mannose" al IgM au toate aceeași structură a miezului este foarte compatibilă cu teoria intermediarului lipidic implicat în sinteza miezului oligozaharidic al lanțului legat de proteine (fig. 4). Diferențele observate între structurile oligozaharidice sînt

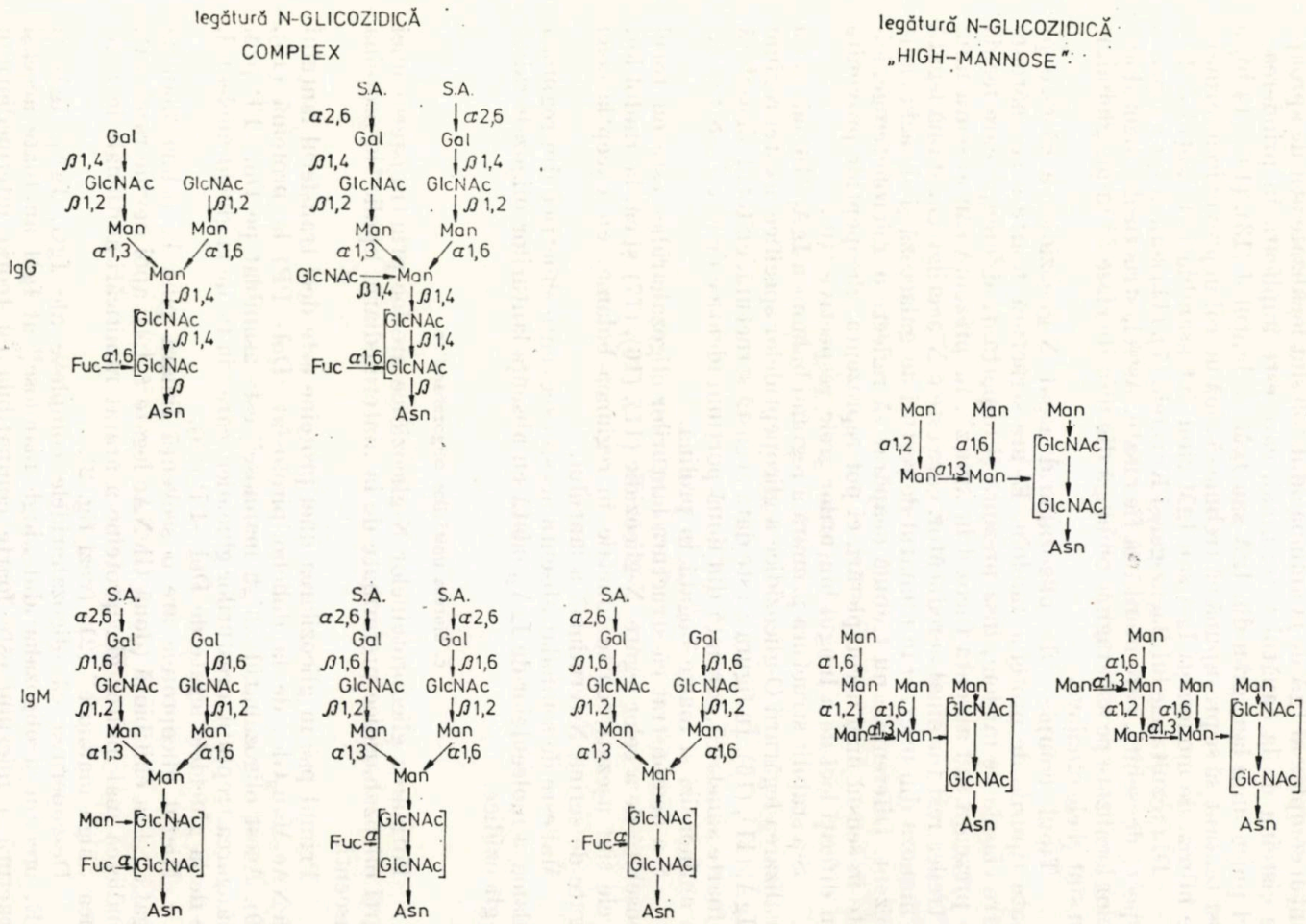


Fig. 1 a. — Structurile oligozaharidelor prezente în proteinele mielom IgG și IgM.

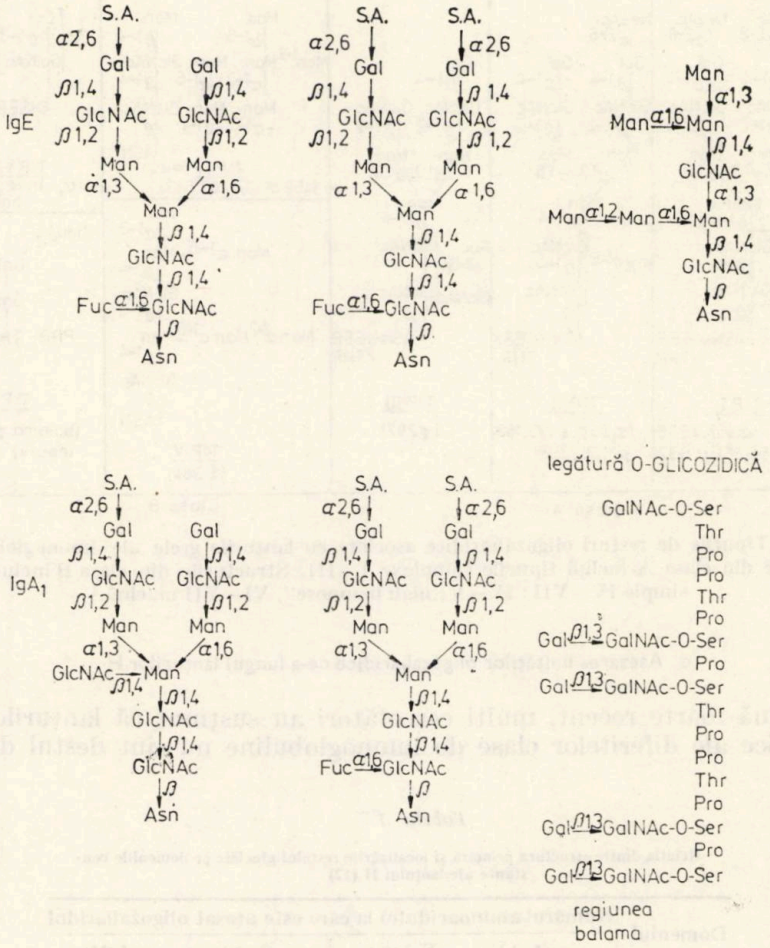


Fig. 1 b. — Structurile oligozaharidelor prezente în proteinele mielom IgE și IgA_1.

datorate transferazelor, care transferă glucidul de la glucidul-nucleotid la miez, după ce el a fost transferat la peptide (22). Transferazele implicate în transferul miezului de la lipid la asparagină nu au nevoie să fie specifice; aceeași enzimă poate transfera același miez în diferite locuri de-a lungul lanțului peptidic, unde întîlnește tripletul propus de Marshall (6). Adăugarea ulterioară a manozei pentru lanțul „high mannose" ori de cantități variate de N-acetilglucozamină, galactoză, fucoză și acid sialic pentru lanțul complex trebuie să fie funcție de glicoziltransferaze individuale. Aceasta are loc la nivelul membranei plasmatice în timpul secreției. Singura excepție a acestui mecanism sintetic ar putea fi oligozaharidul „high mannose" al IgE, deoarece nu are structura miezului tipic chitibiozic (11).

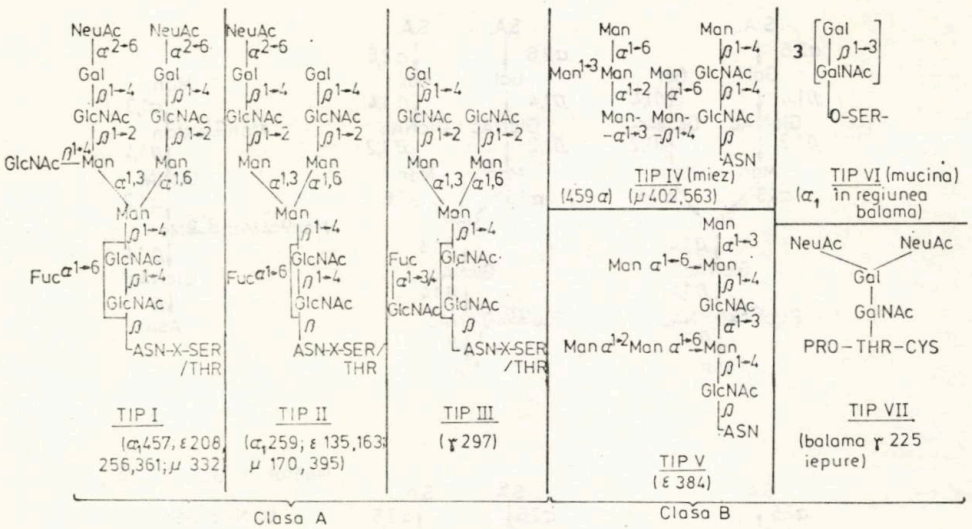


Fig. 2. — Tipurile de resturi oligozaharidice asociate cu lanţurile grele ale imunoglobulinelor. Structurile din clasa A includ tipurile complexe I—III. Structurile din clasa B includ tipurile simple IV—VII : IV—V „high mannose", VI—VII mucină.

d. Aşezarea unităţilor oligozaharidice de-a lungul lanţurilor H

Pînă foarte recent, mulţi cercetători au susţinut că lanţurile oligozaharidice ale diferitelor clase de imunoglobuline nu sînt destul de simi-

Tabela 1

Relaţia dintre structura primară şi localizările resturilor glucidic pe domeniile constante ale lanţului H (12)

Domeniul	Numărul aminoacidului la care este ataşat oligozaharidul			
	$\alpha_{1,2}$(IgA)	Σ(IgE)	γ(IgG)	μ(IgM)
C_H1	224s	135c		170c
	230s	163c		174c(?)
	232s	208c		
C_H2	238s			
	240s	255c		
	259c		297c	
	263c			
C_H3	337c			
		361c		332c
		384s		395c
C_H4	453c			402s
	457s			
	459s			

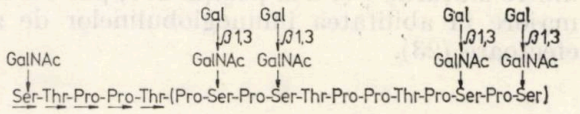
c = unităţi complexe; s = unităţi simple

lare pentru a le putea atribui roluri funcţionale. De fapt, nu existau date suficiente pentru a putea trage alte concluzii. Nu se cunoşteau nici sec-

venţele totale ale aminoacizilor fiecărui lanţ greu al claselor de imunoglobuline şi nici structurile exacte ale lanţurilor oligozaharidice.

Cînd structurile lanţurilor imunoglobulinelor au fost aliniate cu deleţia extradomeniilor la lanţurile μ şi Σ, s-au văzut omologii semnificative (23) (fig. 5).

Fig. 3. — Repartizarea lanţurilor oligozaharidice legate O-glicozidic din regiunea balama a proteinelor mielom IgA_1.



Există cel puţin 11 localizări pentru legăturile N-glicozidice în patru clase de imunoglobuline umane a căror secvenţă a fost determinată. Şapte localizări sînt exact omologe, în ciuda faptului că lanţul γ are doar un

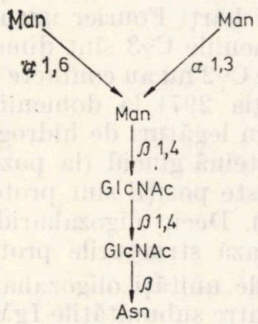


Fig. 4. — Structura „miezului", comună tuturor oligozaharidelor complexe.

oligozaharid, lanţul μ cinci, lanţul Σ şase şi lanţurile α au 2, 4 sau 5, dependent de subclase şi allotipuri. Cu excepţia unei secvenţe Asn-Pro-Ser în α_1 şi

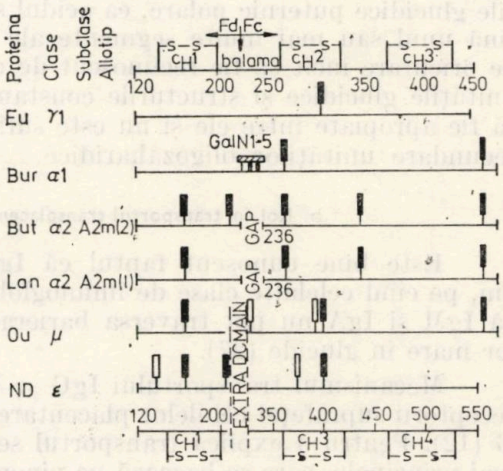


Fig. 5. — Localizarea resturilor glucidice în lanţurile grele ale imunoglobulinelor umane.

Dreptunghiurile verticale reprezintă tipurile legate N-glicozidic. Simbolul Gal N 1—5 reprezintă poziţia tipurilor legate O-glicozidic. Numerele în scala de sus indică poziţia aminoacizilor pentru lanţurile γ şi α. Numerele din scala de jos indică poziţia aminoacizilor pentru lanţurile μ şi ε.

allotipul A_2m (1), toate secvenţele Asn-X-Ser/Thr în structurile primare ale regiunilor constante au ataşate lanţuri cu miez chitibioză (23).

De fapt, secvenţa Asn-X-Ser/Thr are un potenţial foarte mic pentru α-helix sau pliere β, dar un mare potenţial pentru rotirea sau plierea sinuoasă (24).

În felul acesta, tripeptidul tinde să plaseze lanţurile oligozaharidice pe suprafaţa imunoglobulinelor şi diferenţele structurale, de exemplu dintre lanţurile γ şi α la poziţia 297, pot contribui la diferenţele funcţionale majore în abilitatea imunoglobulinelor de a-şi exercita proprietăţile lor efectoare (23).

II. ROLUL COMPONENTEI GLUCIDICE A IMUNOGLOBULINELOR

a. Rol în stabilizarea moleculelor de imunoglobuline şi de izolare a domeniilor

Analiza structurală completă a fragmentului Fc din lanţul γ la o rezoluţie de 3,5 Å a permis construirea unei hărţi Fourier izomorfe, care include şi părţile glucidice. S-a găsit că domeniile Cγ3 sînt dimerizate, la fel ca domeniile Cγ1 şi C_1, în timp ce domeniile Cγ2 nu au contacte reciproce. Oligozaharidele sînt ataşate covalent (poziţia 297) la domeniile Cγ2 şi acoperă faţa domeniilor Cγ2 foarte strîns prin legături de hidrogen la resturile 258, 260 şi 298. Alte interacţiuni proteină-glucid (la poziţiile 241, 243, 262 şi 264) par să fie hidrofobice şi aceste poziţii sînt protejate faţă de solvent de către glucidele suprapuse (25). Deci, oligozaharidele, ca şi legăturile disulfidice, stabilizează şi protejează structurile proteice (12).

S-a sugerat că numărul relativ mare de unităţi oligozaharidice din IgM ar servi drept „spacer" (despărţitoare) între subunităţile IgM polimer, prevenind astfel blocajul steric între situsurile de legare a antigenelor (26).

Deoarece glucidele se găsesc cel mai adesea între domeniile compacte ale Fc, este de presupus că lanţurile oligozaharidice contribuie de asemenea la izolarea funcţiilor domeniilor, acţionînd ca despărţitori. De fapt, resturile glucidice puternic polare, ca acidul sialic, ar putea fi necesare să menţină unul sau mai multe segmente ale lanţului polipeptidic într-o astfel de orientare încît să fie recunoscut de către receptorii Fc. În consecinţă, unităţile glucidice şi structurile constante legate de receptorii Fc trebuie să fie apropiate între ele şi nu este suficient deci să atribui simple roluri secundare unităţilor oligozaharidice.

b. Rol în transportul transplacentar al imunoglobulinelor

Este bine cunoscut faptul că IgG este trecută transplacentar la om, pe cînd celelalte clase de imunoglobuline nu sînt. Iniţial s-a presupus că IgM şi IgA nu pot traversa bariera placentară, datorită conţinutului lor mare în glucide (27).

Mecanismul transportului IgG se bazează pe recunoaşterea de către receptorii suprafeţei celulelor placentare a regiunii Fc a imunoglobulinelor G (12). Pentru a explica transportul selectiv al IgG s-au emis trei teorii mai principale, care se bazează pe pinocitoză, ca cel mai important proces biologic (12).

Am selectat acele date care aduc argumente în eventuala implicare a lanţurilor glucidice în acest proces.

Prin studii cinetice și de specificitate s-a arătat că IgG omologă este transportată preferențial față de IgG heterologă (28), (29). Dar chiar în sistemele omologe apar prinderi preferențiale ale speciilor de IgG cu migrare electroforetică mai înceată comparativ cu prinderea unui component mai anodic (30). S-a arătat că există o relație directă între electronegativitate, conținutul în acid sialic și transferul placentar (31). Analizele naturii biologice a receptorilor Fc placentari izolați au arătat de asemenea importanța încărcării în prinderea IgG, deoarece schimbări în pH (spre acid) și creșterea concentrației sărurilor descresc prinderea IgG de receptorii Fc (32).

c. Rol în secreția și în polimerizarea imunoglobulinelor

Este cunoscut faptul că intracelular lanțurile grele sînt fără glucide, dar că lanțurile grele cu glucide se găsesc atît intra- cît și extracelular. S-a emis deci ipoteza că secreția imunoglobulinelor ar fi o consecință a recunoașterii de către sistemul de transport extracelular a glucidelor din molecula de imunoglobulină (33). Faptul că secreția și polimerizarea imunoglobulinelor se petrec aproape concomitent cu atașarea ultimelor glucide (fucoză, acid sialic) a sugerat ipoteza că aceste procese pot fi corelate (34). Ipoteza a fost infirmată de faptul că inhibarea cu 2-deoxi-D-glucoză a atașării fucozei și acidului sialic la moleculele de IgG din celulele tumorale plasmocitare nu afectează secreția extracelulară a acestor molecule (35). Hickman (35 b) a arătat însă că secreția din celulele plasmatice ale IgA și IgE nou sintetizate este blocată de către tunicamicină, care inhibă atașarea N-acetilglucozaminei la transportorul lipidic, care este dolichol-fosfatul, blocînd astfel glicozilarea inițială, cu „miezul glucidic", a glicoproteinelor.

Aceste date sugerează participarea glucidelor conjugate mai degrabă în procesele de recunoaștere intracelulară decît în procesele de export selectiv.

În privința secreției formelor polimere, inițial s-a insistat asupra rolului componentei glucidice (36), (37), pentru ca ulterior să se pună accentul pe lanțul J, ca componentul major al polimerizării, împreună cu o enzimă care catalizează schimbul disulfidic, anume tiol-proteindisulfid-oxidoreductaza (TPO) (38).

Unele lucrări mai recente revin la rolul lanțurilor glucidice în procesul de polimerizare, arătînd că, odată deglucidizate, formele monomere obținute prin reducere nu se mai refac, chiar în prezența lanțului J și a enzimei de interschimb (TPO), asemănător cu refacerea monomerilor normali (39).

De menționat din nou prezența lanțului „high mannose" al IgM la aminoacidul 563 și a lanțului complex al IgA la aminoacidul 459 foarte aproape de cisteina de la capătul C-terminal, care este implicată în prinderea lanțurilor grele cu lanțul J la formele polimere la IgM (13), (14) sau cu SC și lanțul J la SIgA (14 b). S-a presupus pentru ele rolul de prevenire a formării de hibrizi între monomerii IgA și IgM (15). Faptul că cele două unități oligozaharidice sînt deosebite, fiecare clasă de imunoglobuline avînd

un tip caracteristic, simplu sau complex, ne-a sugerat participarea lor activă în procesul de polimerizare specific fiecărei clase. Aceasta cu atît mai mult cu cît lanțul J și enzima sînt aceleași.

d. Rol în reglarea timpului de înjumătățire a imunoglobulinelor circulante

Mecanismele moleculare prin care IgG sînt îndepărtate din circulație au fost denumite generic procese de catabolizare fracționată. După eliberarea din celulele care le sintetizează, fiecare clasă de imunoglobuline are viteze caracteristice proprii de dispariție din circulație.

IgG supraviețuiește în circulație ceva mai mult decît albumina, fiind astfel una din proteinele serice cu cel mai lung T/2 (40). Totuși, IgM are o viteză de catabolizare de 2—3 ori mai mare și o viteză de sinteză de numai o cincime din cea a IgG. În timp ce IgG și IgA au viteze similare de sinteză, marile diferențe în concentrația lor serică se datoresc unei catabolizări de 4—5 ori mai rapide pentru IgA (41).

Se știe că vitezele de catabolizare ale subclaselor de IgG sînt influențate de concentrația lor relativă în ser, pe cînd T/2 ale IgA și IgM sînt independente de concentrația lor în ser sau de concentrația IgG din ser.

Două mecanisme generale stau la baza studiului catabolizării fracționate a tuturor glicoproteinelor și acestea se pot deosebi prin gradul de specificitate prin care ele îndepărtează imunoglobulinele modificate din circulație.

Primul include o clasă relativ largă de procese nespecifce asemănătoare filtrării, ca cele care funcționează la nivelul rinichiului. Mulți produși de scindare proteolitică a imunoglobulinelor, agregate de IgG, ca și IgG și IgA intacte, însă nu IgM, pot fi găsiți în urină sau prinși în rinichi (42). Numai că mecanismele implicate în readsorbția glomerulară sau eliminarea urinară a imunoglobulinelor îmbătrînite, modificate sau agregate sînt complet necunoscute (12).

1. Rolul fragmentului Fc

Al doilea tip de mecanisme implică prinderea mediată de receptori a structurilor imunoglobulinelor. În condiții experimentale, studiile pe subunitățile de imunoglobuline au permis așezarea preliminară a markerilor catabolici în regiunea Fc. Vitezele de catabolizare ale lanțurilor L și ale fragmentelor Fab și $F(ab')_2$ sînt de 50—100 de ori mai mari decît ale IgG negative (43). Totuși, catabolismul pieselor Fc este similar cu cel al IgG intacte (44), (45). Structurile regiunii Fc, care sînt „recunoscute" de către mecanismele catabolizării, sînt atît peptidice (45), cît și glucidice (47).

Diferența de sarcină electrică dintre fragmentele Fc și Fab pot fi responsabile pentru filtrarea glomerulară mai puțin specifică, dar mai rapidă, a fragmentului Fab (46) și a anticorpilor IgG agregați sau modificați chimic (47 b).

Rolul lanțurilor oligozaharidice în procesul de catabolizare este susținut și de datele care indică o metabolizare mult mai înceată pentru IgG-anticorp cu afinitate mică decît pentru IgG-anticorp cu afinitate mare

(48). Fenomenul s-ar datora diferențelor în compoziția în glucide observate anterior între subpopulațiile cu afinități joase și cele cu afinități mari (49), (50).

2. Rolul domeniului C_H2

S-a demonstrat că din fragmentul Fc regiunea Cγ2 și structurile oligozaharidice interdomenii sînt implicate în controlul vitezelor de catabolizare ale IgG. T/2 ale fragmentelor Cγ2 și Cγ3 marcate și circulante sînt total diferite, cel al domeniului Cγ2 fiind similar cu al IgG intacte (45), (46).

Structurile responsabile sînt probabil altele decît cele implicate în acțiunea C′ sau în adeziunea la receptorii Fc ai macrofagelor (46). Deci, atît domeniul Cγ2, cît și lanțurile glucidice interdomenii sînt implicate, dar gradul de implicare nu este cunoscut.

Diferența de sarcină electrică a domeniului Cγ2 față de fragmentul Fab poate explica resorbția glomerulară a domeniului Cγ2 (45).

3. Rolul acidului sialic

Prezența resturilor de acid sialic care acoperă restul galactozil la capătul lanțurilor oligozaharidice s-a arătat a fi un factor important în catabolismul unui număr de glicoproteine serice (51). Alte glicoproteine serice, ca transferina (52) sau IgG (45), (52), nu se comportă la fel. S-a arătat apoi că transferina umană are galactoza ca penultim rest și deci are o comportare similară cu celelalte glicoproteine, pe cînd transferina de la alte animale nu o are și de aceea nu se comportă similar (53). Factorul decisiv deci este îndepărtarea acidului sialic cu eliberarea restului de galactoză, care este recunoscut de către receptorii celulelor hepatice, receptori care nu se găsesc pe celulele Kupffer și care sînt aceiași pentru toate tipurile de asialoglicoproteine.

Comportarea anormală a IgG nu are încă o explicație. Se presupune că legarea de tip β 1,6 a restului de galactoză de N-acetilglucozamină la IgG față de legarea de tip β 1,4 la celelalte glicoproteine poate fi cauza comportării anormale a IgG.

Se știe că în structura unității complexe a IgG, la aminoacidul 297, nu se găsește acidul sialic (7), (11) și deci presupunerea lui Yasmeen și colab. (45) că lipsa acidului sialic duce la comportarea anormală a IgG este confirmată.

Melchers a arătat că imunoglobulinele intracelulare din celulele de șoarece care nu au restul galactoză terminal sînt catabolizate mult mai rapid decît imunoglobulinele secretate extracelular, care au o structură glucidică completă (citat în (12)).

Mai recent s-a demonstrat că anticorpii de iepure de tip IgG antihaptenă prezintă modificări ale timpului de supraviețuire în circulație după tratare cu sialidază, în sensul unei rapide dispariții din circulație cu localizarea lor în ficat. După tratarea ulterioară cu β-galactozidază se restaurează timpul normal de supraviețuire. Îndepărtarea glucidului următor N-acetilglucozamina conduce la un timp de supraviețuire cu o valoare intermediară între asialo și asialogalacto-IgG și la o localizare crescută în rinichi (47).

Deci, unele imunoglobuline de tip IgG, ca acestea de iepure, au o comportare similară celorlalte glicoproteine serice.

Prinderea asialoglicoproteinelor de membranele plasmatice celulare este un proces strict dependent de ionul de Ca^{++}, care nu poate fi înlocuit cu alți ioni, ca Mg sau Mn (52). Acest fapt poate fi pus în legătură cu descoperirea recentă că acidul sialic poate acționa ca un glucid care prinde Ca (54). În acest sens, se poate presupune că lanțul oligozaharidic cu acidul sialic poate contribui cu prezența Ca în timpul activării C′ (12).

Receptorii pentru penultimul glucid, galactoza, s-au definit și izolat din celule hepatice (55), (56); ei trebuie să conțină acid sialic (prin desializare își pierd capacitatea de prindere) (57). Asupra naturii lor s-a emis ipoteza că ar fi glicoziltransferaze localizate pe suprafața hepatocitului (58), (59), ipoteză care nu a fost confirmată ulterior (60). În aceeași lucrare se menționează prezența receptorilor la nivelul membranei citosolice a lizozomilor, prezență pe care autorii o pun în legătură cu reinserția lor în membrana plasmatică a hepatocitului, după ce au fost complexați și transmiși împreună cu asialoglicoproteina în lizozomi (60).

4. Rolul componentei centrale (al „miezului") din complexele glucidice

De la descoperirea activității endo-N-acetilglucozaminidazei în țesuturile de șobolan și de porumbel (61) s-a presupus că enzima este lizozomală și joacă un rol central în metabolismul glicoproteinelor (61), (62). Presupunerea este susținută de descoperirea prezenței oligozaharidelor cu resturi terminale reducătoare, ca N-acetilglucozamina, în urina pacienților cu glicoproteinaze (63), indicînd astfel că o endo-N-acetil-glucozaminidază a acționat în absența activităților exoglicozidazelor.

Prin întrebuințarea tunicamicinei, inhibitor al glicozilării inițiale a glicoproteinelor cu „miezul glucidic", s-a descoperit că precursorii neglicozilați ai multor glicoproteine sînt supuși proteolizei intracelulare, dar nu și cei ai imunoglobulinelor (63 b).

Foarte recent, întrebuințîndu-se substanțe sintetice specifice, s-a cercetat distribuția intracelulară a endo-N-acetilglucozaminidazei și s-a găsit a fi localizată în principal în citosol (64). Lipsa activității lizozomale susține ipoteza după care catabolismul glicoproteinelor extracelulare pornește prin acțiunea endo-N-acetilglucozaminidazelor din citosol (62).

Studiindu-se T/2 al diferitelor componente glucidice ale glicoproteinelor din membrana plasmatică, s-au constatat mari diferențe între ele și între ele și componentele proteice. Deoarece T/2 al glucidelor terminale și subterminale este mult mai scurt decît al părții proteice, indicînd un turnover al glucidelor terminale și subterminale, se presupune că turnoverul proteinei este modulat de turnoverul glucidelor (65).

Se preconizează din ce în ce mai mult existența și a altor receptori pentru glicoproteine degradate, nu numai a celor care recunosc restul galactoză, ci și a receptorilor pentru N-acetilglucozamină (66) sau pentru manoză (67).

e. Rol în proprietățile biologice ale imunoglobulinelor

Acidifierea blîndă a IgG nu alterează ireversibil proprietatea de anticorp, dar alterează abilitatea IgG reneutralizate de a fixa C′ și de a prinde C_{1q} (12). Deoarece tratamentul anticorpilor IgG cu enzime care deglico-

zidează complet IgG de iepure împiedică de asemenea legarea complexelor antigen-anticorp de C_{1q} (12), se presupune că acidifierea denaturează structurile complexe glucid-proteină din domeniul Cγ2 (12).

De altfel, este semnalată similitudinea dintre hidroliza glicozizilor cu acizi sau cu enzime glicozidazice (68).

Hidroliza IgG-anticorp cu endo-acetilglucozaminidaza D a condus la descreșterea activității anticorpilor antibacterieni în fixarea complementului și în opsonizare, dar nu a schimbat activitățile altor tipuri de anticorpi IgG (69).

Hidroliza anticorpilor de iepure IgM și IgG, antipneumococi și antistreptococi, cu glicozidaze din *D. pneumoniae* a condus la creșterea fixării complementului de către anticorpii IgM și la o descreștere evidentă a acesteia la anticorpii IgG antipneumococi. Nu s-au obținut schimbări în cazul IgG antistreptococi (69 b).

Într-un studiu recent s-au putut îndepărta 83 % din glucidele neutre, 90 % din acidul sialic și 65 % din N-acetilglucozamină prin glicozidazele din *D. pneumoniae*, din IgG de iepure și s-a constatat că regiunea GlcNAc-Mn a lanțului oligozaharidic al IgG este necesară pentru prinderea la receptorul Fc și la complement (70). Activitatea de hemaglutinare a anticorpilor IgG a rămas neschimbată, indicînd că proprietatea de anticorp nu a fost afectată (70). Totuși, citotoxicitatea mediată celular și dependentă de anticorp, formarea rozetelor și hemoliza mediată de complement au fost scăzute (70). Întrebuințînd anticorpi IgG intacți, s-a arătat că glucidele libere, în special N-acetilglucozamina, inhibă cele trei reacții imunologice, dar nu inhibă hemaglutinarea.

III. ENZIME GLICOZIDAZICE CA AGENȚI DE SCINDARE A LANȚURILOR GLUCIDICE

În 1974 au fost publicate simultan două lucrări care prezentau separarea și purificarea unor enzime glicozidazice, de tip endo-N-acetilglucozaminidaza, din două surse deosebite, *D. pneumoniae* (71) și *Streptomyces griseus* (72). Se prezenta de asemenea scindarea lanțurilor oligozaharidice din cîteva glicoproteine mai importante (71), (73).

Ulterior s-au comparat modurile de acțiune a celor două enzime și proprietățile lanțurilor oligozaharidice care sînt necesare activității lor (74).

Enzima din *Streptomyces griseus*, numită și **endo-β-N-acetilglucozaminidaza H** (72), acționează preferențial pe oligozaharidele de tip 1 legate la asparagină (fig. 6), unde R′ și R″ sînt mono- sau oligozaharide de tip manoză legate α, sau de tip N-acetilglucozamină legate β.

Endoglicozidaza din *D. pneumoniae*, denumită și **endo-β-N-acetilglucozaminidaza D** (71), hidrolizează numai oligozaharidele de tip 2 (fig. 6), în care Man α, (1—3) nu este substituită (75). În compusul de tip 2, R‴ poate avea aceeași structură cu R′ sau R″ din compusul de tip 1.

Prezența unui rest α-manoză nesubstituit este esențială pentru acțiunea endoglicozidazei D. Astfel, compararea vitezelor de hidroliză ale glicopeptidelor 5 și 7 (fig. 7) indică o hidroliză de 1 000 de ori mai mare a compusului 5 decît a compusului 7(75). Singura diferență structurală

dintre cei doi compuși este atașarea restului Manα (1—2) la Manα (1—3), la compusul 7.

Ceea ce este foarte important este că ambele enzime acționează la nivelul „miezului" comun atît pentru unitățile complexe, cît și pentru unitățile „high mannose".

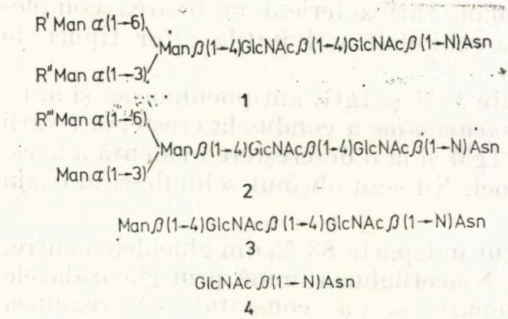


Fig. 6. — Substrate pentru endo-acetilglucozaminidaze (compușii 1, 2 și 3) și produsul final de digestie a acestor substrate de către enzime (compusul 4).

Un al treilea tip de enzimă din acest grup, **endo-β-N-acetilglucozaminidaza L**, este prezent tot în *Streptomyces griseus* (72). El acționează

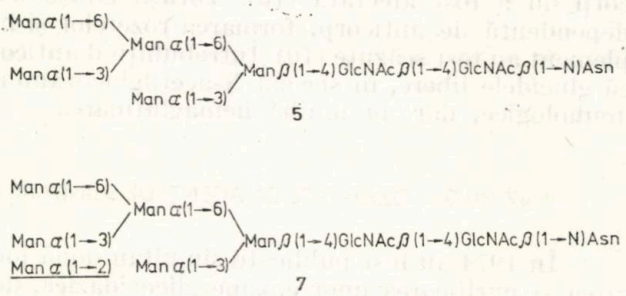


Fig. 7. — Influența prezenței Man α(1—2) asupra vitezei de reacție a endoglicozidazei D.

pe trizaharidul legat de asparagină, de tip 3 (fig. 6), hidrolizîndu-l la dizaharidul Man β (1—4)-GlcNAc și N-acetilglucozaminil-asparagină (compusul 4) (fig. 6). Ultimul este de asemenea produsul de hidroliză al lanțurilor mult mai complexe 1 și 2 de către endoglicozidazele H și D.

Nici una din endoglicozidazele izolate pînă în prezent nu este capabilă să hidrolizeze glicopeptidul complex intact de tipul 9, care este comun la toate glicoproteinele animale (76) (fig. 8).

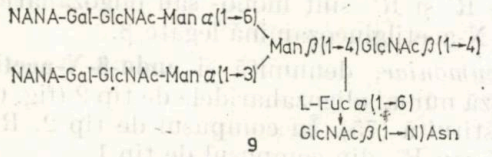


Fig. 8. — Lanțul oligozaharidic complex comun tuturor glicoproteinelor animale.

Asemenea glicopeptide sînt totuși hidrolizate de către endoglicozidaza D după îndepărtarea acidului sialic periferic și a resturilor de galactoză și N-acetilglucozamină și de către endoglicozidaza H după îndepărtarea ulterioară și a fucozei legate de miez (77.)

BIBLIOGRAFIE

1. C. A. Abel, H. M. Grey, Nature, New Biol., **233**, *29* (1971).
2. J. R. Clamp, I. Johnson, în *Glycoproteins*, ed. A. Gottschalk, Elsevier, Amsterdam, 1972, part. A, p. 630.
3. J. P. Vaerman, citat de J. F. Heremans, în *Immunoglobulin A* din *The Antigens*, ed. M. Sela, Academic Press, New York, vol. 2, 1974, p. 365.
4. M. Tomana, W. Niedermeier, J. Mestecky, W. J. Hammack, Immunochemistry, **9**, *933* (1972).
5. E. Ganea, G. Ionescu, St. cerc. biochim., **20**, *95* (1977).
6. R. D. Marshall, Biochem. Soc. Symp., **40**, *17* (1974).
7. J. Baenziger, S. Kornfeld, J. biol. Chem. **247**, *7260* (1974).
8. S. Hickman, R. Kornfeld, C. K. Osterland, J. biol. Chem., **247**, *2156* (1972).
9. J. Baenziger, S. Kornfeld, S. Kochwa, J. biol. Chem., **249**, *1889* (1974).
10. J. Baenziger, S. Kornfeld, S. Kochwa, J. biol. Chem., **249**, *1897* (1974).
11. J. Baenziger, S. Kornfeld, J. biol. Chem., **249**, *7270* (1974).
12. J. L. Winkelhake, Immunochemistry, **15**, *695* (1978).
13. S. P. Hauptman, T. B. Tomasi, J. biol. Chem., **250**, *3891* (1975).
14. R. M. Chapuis, M. E. Koshland, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **71**, *657* (1974).
14 b. T. Eskeland, P. Brandtzaeg, Immunochemistry, **11**, *161* (1974).
15. E. Della Corte, R. M. E. Parkhouse, Biochem. J., **136**, *597* (1973).
16. B. Frangione, C. Wolfenstein-Todel, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **69**, *3673* (1972).
17. V. Moore, F. W. Putnam, Biochemistry, **12**, *2361* (1973).
18. P. W. Robbins, Biochem. Soc. Trans., **7**, *320* (1979).
19. E. Li, I. Tabas, S. Kornfeld, J. biol. Chem., **253**, *7762* (1978).
20. A. J. Parodi, L. F. Lebir, Biochim. biophys. Acta, **559**, *1* (1979).
21. E. Li, S. Kornfeld, J. biol. Chem., **254**, *2754* (1979).
22. S. Roseman, Chem. Phys. Lipids, **5**, *240* (1970).
23. A. Torano, Y. Tsuzukida, Y. S. Liu, F. W. Putnam, Proc. nat. Acad. Sci., Wash., **74**, *2301* (1977).
24. P. Y. Chon, G. D. Fasman, Biochemistry, **13**, *211* (1974).
25. J. Deisenhofer, P. M. Cohman, O. Epp, R. Huber, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **357**, *1421* (1976).
26. N. M. Hurst, W. Niedermeyer, J. Zikan, J. C. Bennett, J. Immunol., **110**, *840* (1973).
27. W. A. Hinrichs, D. G. Smyth, Immunology, **18**, *759* (1970).
28. E. A. Jones, T. A. Waldmann, J. clin. Invest., **51**, *2916* (1972).
29. S. Sonada, M. Schlamowitz, J. Immunol., **108**, *807* (1972).
30. W. A. Hemmings, R. E. Jones, W. Page-Faulk, Immunology, **28**, *411* (1975).
31. D. D. Tsay, M. Schlamowitz, J. Immunol., **115**, *93* (1975).
32. K. Hillman, M. Schlamowitz, A. R. Shaw, J. Immunol., **118**, *782* (1977).
33. D. Schubert, J. mol. Biol., **51**, *287* (1970).
34. E. Della Corte, R. M. E. Parkhouse, Biochem. J., **136**, *589* (1973).
35. F. Melchers, J. Andersson, Transplant Rev., **14**, *76* (1973).
35b. S. Hickman, J. biol. Chem., **252**, *4402* (1977).
36. R. M. E. Parkhouse, F. Melchers, Biochem. J., **125**, *235* (1971).
37. F. Melchers, Biochemistry, **11**, *2204* (1972).
38. R. M. E. Parkhouse, E. Della Corte, Biochem. J., **136** *607* (1973).
39. R. Kleine, F. V. Shmakova, V. A. Lapuk, G. V. Vikha, E. D. Kaverzneva, Immunochemistry, **12**, *825* (1975).
40. T. A. Waldmann, W. Strober, Progr. Allergy, **13**, *1* (1979).
41. E. R. Steihm, J. P. Vaerman, H. H. Fudenberg, Blood, **28**, *918* (1976).
42. F. J. Bourne, J. Curtis, L. S. Wah, Immunology, **24**, *1* (1973).
43. R. D. Wochner, W. Strober, T. A. Waldman, J. exp. Med., **126**, *207* (1967).
44. H. L. Spiegelberg, W. O. Weigle, J. Immunol., **95**, *1034* (1968).
45. D. Yasmeen, J. R. Ellerson, K. J. Dorrington, R. H. Painter, J. Immunol., **116**, *518* (1976).
46. W. P. Arend, D. E. Webster, J. Immunol., **118**. *395* (1977).
47. J. L. Winkelhake, G. L. Nicolson, J. biol. Chem, **251**, *1074* (1976).
47b. J. L. Winkelhake, J. biol. Chem., **252**, *1865* (1977).
48. E. W. Voss, M. Voss, Immunochemistry, **14**, *741* (1977).
49. H. M. Howell, H. E. Conrad, E. W. Voss, Immunochemistry, **12**, *111* (1975).
50. J. E. Mitchell, H. E. Conrad, E. W. Voss, Immunochemistry, **13**, *659* (1976).

51. A. G. Morell, R. A. Irvine, I. Sternlich, H. Scheinberg, G. Ashwell, J. biol. Chem.,**243**, *155* (1968).
52. G. Ashwell, A. G. Morell, Advanc. Enzyme., **41**, *99* (1974).
53. M. W. C. Hatton, E. Regoeczi, K. L. Wong, Canad. J. Biochem., **52**, *845* (1974).
54. L. W. Jaques, E. B. Brown, J. M. Barrett, J. biol. Chem., **252**, *4533* (1977).
55. T. Kawasaki, G. Ashwell, J. biol. Chem., **251**, *1296* (1976).
56. T. Kawasaki, G. Ashwell, J. biol. Chem., **251**, *5292* (1976).
57. W. E. Pricer, G. Ashwell, J. biol. Chem., **246**, *4825* (1971).
58. R. L. Hudgin, G. Ashwell, J. biol. Chem., **249**, *7369* (1975).
59. N. N. Aronson, L. Y. Tan, B. P. Peters, Biochem. Biophys, Res. Commun., **53**, *118* (1973).
60. T. Tanabe, W. E. Pricer, G. Ashwell, J. biol. Chem., **254**, *1038* (1979).
61. M. Nishigaki, T. Muramatsu, A. Kobata, Biochem. Biophys. Res. Commun., **59**, *638* (1974).
62. J. Montreuil, Pure appl. Chem., **42**, *431* (1975).
63. L. S. Wolfe, R. G. Senior, N. M. K. Ying Kin, J. biol. Chem., **249**, *1828* (1974).
63b. M. Geison, Nature, **281**, *11* (1979).
64. R. Pierce, G. Spik, J. Montreuil, în *Glycoconjugates*, ed. R. Schauer et al., Georg Thieme, Stuttgart, 1979, p. 372.
65. W. Kreirel, B. Volk, R. Buchsel, W. Reutter, în *Glycoconjugates*, ed. R. Schauer et al., Georg Thieme, Stuttgart, 1979, p. 289.
66. T. Kawasaki, G. Ashwell, J. biol. Chem., **252**, *6536* (1977).
67. D. L. Achord, F. E. Brot, W. S. Sly, Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**, *409* (1977).
68. H. M. Flowers, N. Sharon, în *Advances in enzymology* vol. 48, ed. A. Meister, J. Wiley and Sons, New York — Chichester — Brisbane — Toronto, 1979, p. 29.
69. R. D. Williams, C. K. Osterland, S. Margherita, S. Tokunda, R. P. Messnery, J. Immunol., **111**, *1690* (1973).
69b. G. Ionescu, Z. Moldoveanu, I. Moisa, C. Motaș, Rev. roum. Biochim., **14**, *19* (1977).
70. N. Koide, M. Mose, T. Muramatsu, Biochem. Biophys. Res. Commun., **75**, *838* (1977).
71. N. Koide, T. Muramatsu, J. biol. Chem., **149**, *4897* (1974).
72. A. L. Tarentino, F. Mahley, J. biol. Chem., **249**, *811* (1974).
73. A. L. Tarentino, T. H. Plummer, F. Mahley, J. biol. Chem., **249**, *818* (1974).
74. M. Arakawa, T. Muramatzu, J. Biochem., **76**, *30* (1974).
75. T. Tai, K. Iamashita, M. Ogata-Arakawa, N. Koide, T. Muramatsu, S. Ishiwata, Y. Inoue, A. Kobata, J. biol. Chem., **250**, *9569* (1975).
76. R. Kornfeld, S. Kornfeld, Ann. Rev. Biochim., **4**, *21* (1976).
77. A. L. Tarentino, F. Mahley, J. biol. Chem., **251**, *6537* (1976).

RECENZII

HÉCTOR N. SEUÁNEZ, *The Phylogeny of Human Chromosomes* (Filogenia cromozomilor umani), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 189 p., 49 fig.

Lucrarea este o abordare interesantă a problemei originii omului prin prisma geneticii moleculare, respectiv a evoluţiei la nivel molecular. Autorul face un studiu comparativ al genomului la om şi la maimuţele mari (cimpanzei, gorile, urangutani) din punctul de vedere atît al cantităţii de ADN cît şi al organizării sale cromozomale, luînd în consideraţie modelele de bandare cromozomală, ADN repetitiv şi nonrepetitiv, ADN satelit, heterocromatina constitutivă, distribuţia cromozomală a genelor ribozomale, encromatina şi heterocromatina, cromozomul X. Pe baza studiilor de cartare genică comparativ la om şi la maimuţe, sînt demonstrate omologii interspecifice ce vin în sprijinul observaţiilor de morfologie şi atestă originea comună a acestor specii din familia *Hominidae*, precum şi căile de evoluţie a cromozomilor umani din cei ai maimuţelor prin rearanjamente structurale ce au avut loc în timpul filogeniei.

Lucrarea, structurată în trei secţiuni şi 18 capitole, cu un material ilustrativ obţinut prin folosirea celor mai moderne metode de investigare din citogenetica moleculară, constituie un material util pentru cei ce lucrează în domeniul citogeneticii moleculare, citotaxonomiei, geneticii umane.

A. Pătraşcu

OTTO G. BIER, DIETRICH GÖTZE, IVAN MOTA, WILMAR DIAS DA SILVA, *Experimentelle und klinische Immunologie* (Imunologie experimentală şi clinică), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1979, 368 p., 146 fig.

Apărută foarte recent, lucrarea reuşeşte ca, într-un spaţiu tipografic restrîns, să ofere cititorului o imagine modernă asupra imunologiei.

Cartea cuprinde patru mari capitole : bazele imunologiei, bazele imunochimiei, bazele imunopatologiei şi implicaţii în medicină (imunohematologie, imunodiagnostic, imunoprofilaxie şi imunoterapie). Materialul este astfel prezentat încît poate fi interesant deopotrivă pentru biochimişti, geneticieni, biologi şi medici. Aspectele privitoare la histologia şi patologia aparatului imun, la diferenţierea acestuia, la mecanismele de reglare ale formării anticorpilor şi structura imunoglobulinelor sînt tratate în lumina datelor noi din acest domeniu. De asemenea, prezentarea sistemului imun în diferite condiţii patologice (boli autoimune, stări alergice etc.) întregeşte tabloul privitor la amplitudinea funcţională a aparatului imun.

Autorii, imunologi cu vechime, au reuşit să adauge autorităţii lor şi avantajul îndelungatei experienţe în domeniul cercetării.

Lucrarea, care a mai apărut în 1977 în limba braziliană, a fost tradusă din limba engleză.

L. Boroş

PATRICK R. DUGAN, *Biochemical ecology of water pollution* (Ecologie biochimică a apelor poluante), Plenum Press, New York—London, 1972, 159 p., 37 fig.

Volumul se ocupă de problema acută a poluării apelor, luînd în considerare relaţiile dintre o serie de poluanţi şi microorganisme. Cuprinde trei părţi importante, şi anume poluarea apei, consideraţii biochimice şi probleme ecologice majore.

În prima parte sînt discutate semnificaţia poluării, conţinutul, cauzele şi conceptul de poluare. Sînt trecuţi apoi în revistă principalii poluanţi care afectează ecosistemele acvatice cu referiri asupra poluanţilor de natură organică, minerală, poluanţilor nebiodegradabili, remanenţi sau care determină contaminări transmisibile prin mai multe verigi.

Capitolul următor se ocupă de problema perspectivelor alimentării cu apă în relaţie cu populaţia, exemplificînd cu date estimate pînă în anul 2020 în S.U.A.

Cel mai dezvoltat este capitolul consideraţiilor biochimice. Este discutat conceptul de adaptare faţă de influenţa mediului poluant. Problema este privită în sensul modificărilor temporare ale caracterelor sau ale mutaţiilor genetice.

După trecerea în revistă a proprietăţilor biochimice şi biologice ale apei, se procedează la explicarea degradării unor poluanţi organici. De asemenea sînt tratate hidroliza polizaharidelor, proteinelor, grăsimilor, descompunerea anaerobă şi fermentarea metanică, oxidarea acizilor graşi şi a alcoolilor, oxidările β şi ω. În volum sînt abordate aspectele oxidării n-alkenelor, cicloalkenelor, grupărilor aromatice, metan, etan şi metanol în legătură cu cîteva grupe de microorganisme (bacterii, drojdii, fungi).

Dintre poluanţii remanenţi în mediu, sînt tratate în capitolele următoare izoalkene, detergenţi, pesticide, lignine.

Sînt trecute în revistă ciclurile nutrienţilor azot, fosfor, hidrogen, oxigen, carbon, sulf şi posibilităţile de convertire în organisme.

Dintre problemele majore ale ecologiei în legătură cu acizii de mină discutate în volum enumerăm : influenţa deversării apelor de mină în sistemele biologice ; influenţa organismelor asupra formării acizilor deşarjaţi şi căile sau mijloacele biologice de tratare-prevenire.

În final se tratează poluarea şi accelerarea eutrofizării în lacuri în legătură cu nutrienţii, microelementele şi grupele de organisme ca bacterii şi alge.

Marioara Godeanu

T. KREMER, L. BOROSS, *Gel chromatography. Theory, Metodology, Applications*, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1979, 199 p.

Constituită din trei părţi, lucrarea tratează la un nivel ştiinţific superior un domeniu de largă actualitate în chimia şi în biochimia analitică şi preparativă, şi anume cromatografia în gel sau cromatografia de excludere moleculară (gel-filtrare).

Partea I : Teorie, prezintă pe parcursul a două capitole datele fundamentale ale separărilor cromatografice prin gel-filtrare, precum şi o descriere a fazelor staţionare utilizate în cromatografia în gel. Autorii folosesc în lucrare termenul de „cromatografie în gel", mai raţional, care să înlocuiască celelalte terminologii ale procesului menţionat.

Partea a II-a este dedicată tehnicilor de lucru în cromatografia în gel, pe coloană, cu accentul pe dezvoltarea unor tehnici speciale (ex. eluţia în gradient în cromatografia în gel).

Partea a III-a cuprinde o amplă trecere în revistă a posibilităţilor de aplicare a cromatografiei în gel în separările proteinelor, acizilor nucleici, polizaharidelor şi altor polimeri.

Un capitol special este dedicat aplicaţiilor cromatografiei în gel în separarea compuşilor organici cu greutăţi moleculare mici şi a ionilor anorganici.

Lucrarea, prezentată într-o formă editorială elegantă, se adresează tuturor cercetătorilor interesaţi în analizele şi separările cromatografice în chimie şi biochimie.

Mircea Mateescu

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of chemicals to Humans. Volume 19 : Some Monomers, plastics and syntetic Elastomers and Acrolein (Monografii IARC asupra evaluării riscului carcinogenic asupra omului. Vol. 19 : Unii monomeri, mase plastice şi elastomeri sintetici şi acroleina), Lyon, IARC, 1979, 513 p.

Volumul prezintă în partea I, în mod integrat, punctele de vedere şi opiniile experte ale specialiştilor Grupului de lucru IARC, întîlnit la Lyon în perioada 7—13 februarie 1978 ; partea a II-a conţine o trecere în revistă, cu caracter monografic, a unui mare număr de substanţe care prezintă riscuri de carcinogeneză pentru om.

Un adevărat îndreptar, studiile monografice din această parte centralizează riscul de carcinogeneză prezentat de o serie de compuși, cum sînt compușii de tip acrilic în polimerii corespunzători, caprolactama și nylonul, propena și polipropena, stirenul și unii copolimeri stirenici, unii izocianați aromatici, acetatul de vinil, poliacetatul și alcoolul polivinilic, halogenurile de vinil și unii polimeri, polivinil-pirolidona și acroleina.

Ample liste bibliografice însoțesc fiecare capitol. Indexul cumulativ cu care se încheie lucrarea face ca materialul, deosebit de bine organizat și sistematic, să fie extrem de util tuturor celor interesați în aceste probleme și în egală măsură forurilor de specialitate din diferite țări.

Mircea Mateescu

V.M. DER LALOUSTIAN, A.K. KURBAN, *Genetic Diseases of the Skin* (Bolile genetice ale pielii), Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1979, 339 p., 441 fig.

Dezvoltarea rapidă a biologiei moleculare a clarificat o serie de aspecte de bază, cum ar fi natura genelor, structura moleculei de ADN și mecanismul sintezei proteice. Cunoașterea deficiențelor enzimatice și a patologiei lizozomale a elucidat patogeneza multor boli genetice și a contribuit la înțelegerea mecanismelor biologice normale. Tehnicile moderne au deschis noi orizonturi geneticii medicale și în special sfatului genetic. Aspectele genetice ale bolilor dermatologice au căpătat astfel o atenție deosebită.

Lucrarea de față prezintă într-un mod concis și foarte bogat ilustrat date recente privind bolile de piele de natură ereditară sau genetică. Cele 19 capitole descriu diferite maladii, clasificate după semnele lor caracteristice sau, acolo unde este posibil, după mecanismele patogenetice. Fiecare maladie este prezentată din punctul de vedere al manifestărilor clinice, patologie, patofiziologie, ereditate și tratament. În cazul unor boli binecunoscute, ca psoriazisul, accentul s-a pus pe aspectele ereditare. Boli foarte rare, ca xerodermita pigmentoasă sau progeria, descrise detaliat, aduc informații esențiale asupra problemelor biologice și medicale fundamentale, cum sînt îmbătrînirea și cancerul.

Autorii prezintă date interesante referitoare la bolile genetice cu deficiență imunologică, bolile țesutului conjunctiv, bolile părului, unghiilor, bolile proliferative, sindroame neurocutanate etc.

Prin aspectele variate prezentate, cartea devine utilă nu numai dermatologilor și geneticienilor, ci și pediatrilor, interniștilor și tuturor specialiștilor interesați în defecte congenitale și anomalii de dezvoltare.

Elena Ganea

Carcinogenic Risks — Strategies for Intervention. Risques cancérogènes — Stratégies d'intervention (Riscuri cancerogenice — Strategii de intervenție), INSERM Symposia series, Volume 74, W. DAVIS & C. ROSENFELD (ed.), IARC Scientific Publications No. 25, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1979, 283 p.

Volumul de față conține lucrările Simpozionului organizat de IARC și de Institutul Național al Sănătății și Cercetării Medicale, ținut la Lyon, la 30 noiembrie — 2 decembrie 1977.

Tematica comunicărilor și, în volum, a articolelor este structurată pe cinci secțiuni: fumatul și cancerul; riscuri profesionale; aditive în hrană, medicamente și pesticide; determinarea riscului cancerogenic și strategiile de intervenție.

În ceea ce privește legătura dintre fumat și cancer, autorii descriu măsurile, inclusiv juridice, din Franța și Finlanda pentru reducerea consumului de tutun. În a doua secțiune, autorii se ocupă, în general, de cancerul provocat în diverse locuri de muncă din țările respective, incriminînd diferite substanțe: azbest, tetracloretilenă etc., și descriu măsurile care au dus la micșorarea riscului. În secțiunile a 3-a și a 4-a sînt descrise riscul cancerogenic și posibilitățile de evaluare pentru diferite adaosuri din mîncare, pentru medicamente și pesticide, menționîndu-se rolul animalelor de laborator. Ultima secțiune se referă la strategia intervenției, incluzînd și formele legale. Fiecare capitol este completat de un rezumat al discuțiilor. Volumul cuprinde și recomandări ale IARC în privința colectării și utilizării datelor.

Vl. Gheordunescu

A. TUYNS, *Alcool et Cancer* (Alcoolul și cancerul), Monographie hors Série, Centre International de recherche sur le cancer, Organisation Mondial de la Santé, Lyon, 1978, 42 p.

Lucrarea, rezultat al unui efort considerabil, prezintă sintetic, centralizat și selectiv în același timp datele provenite dintr-un mare număr de indicații bibliografice de referință (practic tot ceea ce s-a publicat) în domeniul atît de actual al interrelațiilor dintre abuzul de alcool, fumat și cancer.

Volumul constituie versiunea franceză a unui prestigios raport (referat general) prezentat de dr. A. Tuyns la Institutul național pentru abuz de alcool și alcoolism (N.I.A.A.A.) din S.U.A. pentru congresul cu tema „Alcohol and health" (Alcoolul și sănătatea), 1978.

Studiile epidemiologice prospective, care constituie prima parte a lucrării, sînt rezultatul corelării unor aspecte ale relației dintre consumul de alcool, fumat și cancer, în funcție de zonele geografice, de structura și tipurile de populații din diferite țări și continente, de obiceiurile unor secte etc. Sînt amplu comentate relațiile dintre diferitele tipuri de cancer, cu diferite localizări (limbă, faringe, laringe, esofag, stomac, rect, ficat, pancreas, prostată etc.), și multiplele componente ale diferitelor băuturi alcoolice tradiționale, între care și larg comentatele nitrozamine, factori carcinogeni recent descoperiți, hidrocarburile policiclice etc. În încheiere sînt prezentate relațiile dintre dozele cotidiene de alcool, numărul de țigări zilnice și factorii de risc de carcinogeneză, precum și, orientările spre cercetări viitoare în acest domeniu.

Lucrarea prezintă, datorită ansamblului de date expuse în mod integrat, o importanță majoră. Se adresează în primul rînd forurilor medicale din diferite țări, cadrelor de cercetare de specialitate și într-o anumită măsură guvernelor și altor factori de conducere, în considerarea consecințelor alcoolismului.

M. A. Mateescu

Cancer registration and its techniques (Evidența cazurilor de cancer și metodologia de lucru), R. MACLENNAN, C. MUIR, R. STEINITZ și A. WINKLER (ed.), IARC Scientific Publications No. 21, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 235 p.

Prezentul volum, format din 11 capitole, rezultat al cooperării dintre IARC, Unitatea de Cancer a O.M.S. și Asociația internațională de evidență a cancerului, își propune să promoveze dezvoltarea operațiilor de evidență a cancerului, în special în regiunile în care această evidență este deficitară, prin indicarea metodologiei de lucru necesare, și să faciliteze coroborarea internațională a datelor asupra cancerului, dezvoltînd o nomenclatură și definiții comune și adecvate asupra multiplelor aspecte în operațiile de evidență a cancerului.

Tematica abordată în prezentul volum este axată pe probleme de planificare a evidenței cazurilor de cancer, conținutul și sursele informațiilor ce trebuie furnizate de pacienți și fișate în evidența cazurilor respective, operații de intrare a datelor pentru evidență, probleme de clasificare și codificare a neoplasmelor, prelucrarea datelor, aspecte privind evidența cazurilor de cancer în țările în curs de dezvoltare. Materialul, extrem de organizat, dă indicații metodologice clare și ca atare foarte utile pentru serviciile implicate din rețelele medicale privind cadrul organizării evidenței cancerului. Lucrarea este însoțită de un index, care cuprinde codificarea numerică pentru uz internațional a tipurilor de cancer cu diferite localizări, în funcție de vîrsta și sexul pacienților, stadiul de evoluție, datele histologice, datele apariției bolii etc. O listă amplă de referințe bibliografice de actualitate însoțește prezentul material, care este deosebit de util atît forurilor medicale din diverse țări, cît și instituțiilor medicale de profil și cercetătorilor interesați de acest domeniu major al cercetării biomedicale.

Lucrarea prezintă deci o importanță deosebită în sensul promovării unei strategii internaționale de luptă împotriva cancerului, permițînd punerea la dispoziția forurilor internaționale a unor date unitare privind stadiul bolii în diferite regiuni geografice și totodată integrarea eforturilor diferitelor foruri medicale din diferite țări în vederea tratării bolii și combaterii unor serii de factori carcinogenici.

M. A. Mateescu

Ergebnisse der experimentellen Medizin (Rezultate ale medicinii experimentale), vol. 33 : *Struktur und Synthese von Immunoglobulinen und die Bedeutung von Mediatoren bei Immunoreaktionen* (Structura și sinteza imunoglobulinelor și importanța mediatorilor la reacțiile imune), ed. ROLF DARGEL și DIETRICH DETTMER, VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1979, 103 p.

Scopul celor zece articole pe care le conține acest al 33-lea volum din seria „Rezultate ale medicinii experimentale" este de a ne da o imagine a tendințelor de dezvoltare în imunologie.

Se tratează problema structurii anticorpilor în general și a specificității imunologice (J. Gergely), precum și a antigenelor genetice ale imunoglobulinelor umane (M. Turner ; J.B. Natvig), insistîndu-se asupra claselor de imunoglobuline polimere, respectiv IgA (J. Brock) și IgM (G. Zimmermann). Legat de aceste imunoglobuline, Zikan face o scurtă trecere în revistă a progreselor înregistrate în studiul lanțului polipeptidic J, implicat în legarea moleculelor monomere de IgA și IgM în scopul polimerizării intramoleculare a acestora.

În acest volum, problematica imunocitologiei se axează pe interacțiunea dintre macrofage și celulele T în răspunsul imun primar față de eritrocitele heterologe (H. Lemke, H.G. Opitz), pe acțiunea limfochinelor asupra macrofagelor (W. Zschiesche, Bärbel Fahlbusch, Ingrid Schumann) și pe inducerea formării de anticorpi în culturi de celule (S. Wichner, P. Dörfling). Sinteza anticorpilor și reglarea ei, care implică mai multe mecanisme diferite, sînt prezentate de prof. H. Ambrosius. În final, J. Schröder vorbește despre prepararea, caracterizarea și aplicarea în scopuri terapeutice a factorului de transfer.

Materialul acestui volum prezintă interes în egală măsură pentru biochimiști și imunologi.

Zina Moldoveanu

Placental proteins (Proteinele placentare), ed. A. KLOPPER, T. CHARD, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 171 p., 65 fig., 36 tabele.

Volumul de față cuprinde lucrările celei de-a 3-a conferințe trienale de „Endocrinologie a sarcinii", ținută la Aberdeen. Cele 11 lucrări, ai căror autori sînt cercetători de prestigiu din întreaga lume, prezintă rezultate privind diferite aspecte ale proteinelor placentare. Accentul este pus în mod deosebit pe trei-patru proteine de origine trofoblastică, izolate în ultimii ani. Deși semnificația lor clinică nu este cunoscută încă, faptul că aceste proteine apar într-o concentrație crescută în circulația maternă în cursul sarcinii este deja acceptat.

Identificarea, diferite metode de separare și purificare și caracterizarea fizico-chimică și imunologică a proteinelor plasmatice specifice sarcinii sînt prezentate în cuprinsul cărții.

Modificările acestor proteine în diferite condiții fiziologice (gemeni, vîrsta sarcinii) sau patologice aduc un aport însemnat la înțelegerea rolului lor.

Metode specifice și sensibile, ca RIA, au permis detectarea unor cantități mici de SP_1 (o glicoproteină specifică) în stadii foarte timpurii. Măsurarea acestei glicoproteine în ser poate fi utilă în diagnosticul sarcinii și al anomaliilor ei. Această glicoproteină, izolată simultan de diferiți autori, a primit ca urmare denumiri diferite, despre care în momentul de față nu se poate spune sigur dacă se referă totuși la același compus.

Scopul acestei cărți este de a prezenta datele fiziologice și biochimice referitoare la aceste proteine placentare de curînd cunoscute și de a pune probleme pentru cercetări ulterioare ce vor putea elucida mecanismul dezvoltării anormale a sarcinii, oferind bazele unor aplicații clinice.

Elena Ganea

LESLIE N. PYRAH, *Renal Calculus* (Calculul renal), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 370 p., 55 fig.

Lucrarea acoperă întregul domeniu al calculozei renale.

Autorul, cu îndelungată și vastă experiență în domeniul chirurgiei calculozei renale și al cercetării acestui complex grup de boli, prezintă într-un mod concis și bine organizat, în 17 capitole, rezultatele investigațiilor complexe actuale.

În capitolul 1 este tratată ,,Epidemiologia urolitiazei", dieta fiind considerată principalul agent responsabil de incidența crescută a pietrelor renale. ,,Patologia rinichiului — producător de pietre" (capitolul 2) surprinde etapele de formare a pietrei începînd cu nivelul molecular.

Capitolele 3 și 4 se referă la bolile ureterice și renale, complicate cu calculi renali și nefrocalcinoză. Sînt specificate modul de diagnostic și tratamentul adecvat. În capitolul 5, ,,Calculi renali și nefrocalcinoze", calculoza este privită drept rezultatul ingerării anormale a principalelor substanțe chimice conținute în piatră. Nivelul principalilor cristaloizi în urina pacienților cu calculi, conținînd calciu, constituie subiectul capitolului 6.

,,Hiperoxaluria primară și condiții corelate" (capitolul 7) și ,,Hipercalciuria idiopatică" (capitolul 8) sînt tratate din punct de vedere clinic, biochimic și al diagnosticului.

În capitolul 9 sînt menționate substanțele chimice din urină, promotoare, preventive sau inhibitorii ale pietrei renale.

Capitolele 10—13 tratează ,,Calculul renal și ureteric". Ultimul capitol, mult dezvoltat, instructiv prezentat și bogat ilustrat, împărtășește din practica autorului, specialist chirurg urolog.

Grupele speciale de cazuri ale pietrei și tratamentul lor, precum și un tablou complet al cîtorva tipuri de calculi sînt cuprinse în capitolele 14—17. Sînt urmărite patologia, incidența, tabloul clinic, eventual considerații genetice, desigur investigații biochimice sau prin radiodiagnostic și metode de tratament.

Cele peste 1 300 de fișe bibliografice, repartizate specific fiecărui capitol, și indexul de subiecte de la sfîrșitul cărții fac din monografie un desăvîrșit ghid pentru viitorii specialiști. Prin complexele investigații expuse într-un mod critic, propriu specialistului, cartea este mai mult decît utilă specialiștilor, incitînd la noi cercetări în domeniu.

Victoria Dobre

Proceedings in life science : *Plant Growth Regulation*, ed. E.E. PILLET, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 305p., 128 fig.

Volumul de față reprezintă o culegere de articole expuse la a 9-a Conferință internațională asupra substanțelor de creștere a plantelor, care a avut loc la Lausanne între 30 august și 4 septembrie 1976, manifestare științifică de mare prestigiu, la care și-au adus contribuția peste 400 de specialiști din diferite țări.

Cartea reprezintă prin aceasta un material informațional deosebit de util pentru cercetări de fiziologie vegetală și din domeniile înrudite.

Volumul este structurat în 9 capitole, în cadrul cărora sînt prezentate principalele aspecte legate de implicațiile auxinelor în realizarea diverselor procese metabolice celulare esențiale. Se prezintă astfel rolul auxinelor în creșterea prin extensiune a pereților celulari și, legat de aceasta, metabolismul celulozei. Sînt analizate implicațiile fiziologice ale hormonilor vegetali în procesele de transport prin membrane, auxinele și reglarea creșterii și înfloririi plantelor, reglarea hormonală a ciclului diviziunii celulare, senescența ca rezultat al interacțiunilor hormonale.

Într-un capitol aparte sînt prezentate cele mai recente metode de analiză a fitohormonilor, atenție acordîndu-se cromatografiei în gaz și lichid. Un alt capitol prezintă giberelinele și citochininele ca factori endogeni, regulatori ai creșterii.

Se ia în discuție acțiunea substanțelor de creștere asupra plasmalemei în reglarea regenerării pereților celulari ai protoplaștilor, procese deosebit de importante pentru cercetările de inginerie genetică.

Lucrarea se încheie cu capitolul ,,Demonstrațiile lucrărilor" și cu un index de subiecte.

Prin complexitatea aspectelor abordate și prin noutatea multora dintre problemele prezentate, cartea reprezintă o sursă de informare deosebit de utilă în domeniul hormonilor vegetali, domeniu foarte important și actual pentru cercetările de metabolism al celulei vegetale.

Aurelia Brezeanu

Glucocorticoid Hormone Action, ed. J. D. BAXTER and G.G. ROUSSEAU, „Monographs on Endocrinology", vol. 12, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1979, 638 p., 176 fig.

Editarea monografiei reprezintă o contribuție binevenită nu numai în domeniul endocrinologiei, ci și al biochimiei, biologiei celulare și moleculare, geneticii, farmacologiei, deoarece se făcuse simțită necesitatea unei sinteze a tuturor datelor acumulate în legătură cu hormonii glucocorticoizi. Se oferă astfel cititorului un bilanț vast, dar echilibrat, al rezultatelor cercetărilor celor mai moderne în acest domeniu. Monografia, dedicată regretatului savant Gordon M. Tomkins, care a adus contribuții de valoare în studiul glucocorticoizilor, este prefațată de prof. C. De Duve și conține 34 de capitole, încercînd și reușind să treacă în revistă cele mai variate domenii ale acțiunii acestui tip de hormoni.

Primul capitol conține o privire de ansamblu asupra hormonilor glucocorticoizi, etapele istorice ale studierii lor și principalele procese fiziologice la reglarea cărora participă. El formează un schelet pe care pot fi integrate apoi datele cuprinse în capitolele următoare. Sînt expuse, într-o formă sintetică, structura și conformația moleculei glucocorticoizilor și reflectarea acestor proprietăți în mecanismul acțiunii lor la nivel molecular. O atenție specială este acordată receptorilor acestor hormoni : localizarea subcelulară, proprietățile, tehnologiile de purificare, interacțiunea lor cu molecula glucocorticoidă și formarea complexelor receptor-hormon, precum și interacțiunea acestor complexe cu componentele nucleare și factorii care o reglează. Mai multe capitole sînt dedicate mecanismelor reactivității anumitor tipuri de celule la glucocorticoizi. Sînt expuse de asemenea rolul acestor hormoni în diferențierea și în maturarea țesuturilor, inducerea și controlul hormonal al activității unor enzime, implicarea lor în metabolismul glucidic. Ultimele capitole se ocupă de mecanismele de acțiune ale glucocorticoizilor la nivel subcelular, de structura și funcțiile membranelor plasmatice și lizozomilor.

Sinteza multitudinii de date despre acțiunea hormonilor glucocorticoizi reprezintă o reală contribuție la progresul cunoașterii mecanismelor biologice la nivel molecular și facilitează accesul specialiștilor din diverse domenii la cele mai noi date ale literaturii.

Anca Petrescu-Raianu

Nasopharyngeal Carcinoma : Etiology and Control (Carcinoamele nasofaringiene : etiologie și control), G. de THÉ &Y. ITO (ed.), IARC Scientific Publications No. 20, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 610 p.

Volumul de față cuprinde lucrările Simpozionului internațional ținut la 4—6 aprilie 1977 la Kyoto, care a abordat problematica actuală a carcinoamelor nasofaringiene (NPC).

Tematica comunicărilor și, în volum, a articolelor este structurată pe 7 secțiuni : patologia NPC ; aspecte clinice ; epidemiologie ; etiologie — factori genetici și chimici ; etiologie — factori virotici ; etiologie — factori imunologici ; concepte actuale în tratament și cercetarea clinică. Fiecare secțiune cuprinde un rezumat al discuțiilor pe marginea comunicărilor respective.

Participanții la simpozion au format grupuri de specialiști care au discutat problemele cele mai importante în etiologia și controlul carcinoamelor nasofaringiene, au făcut recomandări privind abordarea studiilor NPC și au propus direcțiile prioritare pentru studiile în viitor. De asemenea este publicată o anexă ce cuprinde clasificarea histologică a tumorilor nasofaringiene, recomandată de OMS.

Vl. Gheordunescu

MICHEL BARBIER, *Introduction to Chemical Ecology* (Introducere în ecologia chimică) Longman. London — New York — Amsterdam, 1979, 128 p., 7 tabele, 28 fig.

Lucrarea, forma îmbunătățită a unui curs ținut de autor la universitățile din Paris și Rio de Janeiro, tratează din punct de vedere chimic (biochimic) unele aspecte legate de relațiile ecologice, aspecte abordate pînă în prezent în foarte puține cercetări de anvergură.

Încă din introducere se definește ecologia chimică drept „știința relațiilor chimice dintre ființele vii sau dintre lumea minerală și lumea vie". Se vizează astfel aspecte de tipul celor legate de relații interspecifice (pradă-răpitor, mimetism, bioluminescență), în care intervin fie „armele" chimice, ca toxine, antibiotice, acizi (acetic, cianhidric, formic), chinone, substanțe volatile, fie pigmenți de disimulare, ca melanine, pterine, flavone, pigmenți biliari, fie fotoproteine cu rol în recunoașterea și orientarea speciilor, precum și a celor legate de relații interspecifice (autoreglarea numărului și densității populațiilor, marcarea și delimitarea teritoriului, alarmă și apărare).

Un capitol special este rezervat feromonilor. Feromonii insectelor sînt urmăriți din punctul de vedere al rolului în viața populațiilor respective (feromoni sexuali, de alarmă, de agregare și marcare a teritoriului), precum și ca mijloace de combatere biologică ; feromonii algelor și ciupercilor (fitohormoni de reproducere sau gamoni) sînt descriși în strînsă corelație cu rolul pe care aceștia îl joacă în reproducerea diferitelor specii ; feromonii vertebratelor (în majoritate cetone cu cicluri mari sau acizi grași volatili) sînt menționați în paralel cu mecanismul ecofiziologic de acțiune.

După cîteva exemple de interrelații de natură deopotrivă ecologică și chimică de mare importanță în menținerea echilibrului natural (interrelațiile insecte — plante și om — mediu oceanic), autorul subliniază necesitatea dezvoltării la omul modern a unei gîndiri ecologice, astfel încît să poată răspunde la două necesități imperioase : aprofundarea cunoașterii naturii și punerea la punct a unor tehnologii nepoluante (la ambele putînd să-și aducă o importantă contribuție ecologia chimică).

În cuprinsul lucrării, problemele sînt prezentate foarte documentat (au fost consultate 561 de titluri bibliografice, marea lor majoritate fiind articole publicate în toate marile reviste de profil biochimic, ecologic, zoologic și botanic), constituindu-se astfel o primă sinteză în domeniul ecologiei chimice.

Dragoș D. Neculce

A. V. PALLADIN, YA. V. BELIK și N. M. POLYAKOVA, *Protein metabolism of the brain* (Metabolismul proteic al creierului), traducere din l. rusă, editată de ABEL LAJATHA, New York State Research Institute for Neurochemistry and Drug Addiction, Ward's Island, New York, 1977, 335 p.

Volumul, o lucrare monografică alcătuită din 8 capitole, pune accent în mod egal pe aspectele structurale, dinamice și funcționale ale metabolismului proteic. În capitolul 1 se face o descriere a stadiilor principale și a direcțiilor de bază ale cercetării în domeniul proteinelor și al metabolismului proteic în sistemul nervos. Capitolul 2 prezintă pe larg fracționarea proteinelor tisulare din sistemul nervos, cu referiri la proprietățile fizico-chimice și biologice ale fracțiunilor proteice. Se folosesc metode electroforetice, de fracționare cu ajutorul detergenților a proteinelor bazice și acide.

Capitolul 3 se ocupă de bariera sînge-creier și de transportul aminoacizilor prin membranele celulare.

În capitolul 4 se dau cîteva trăsături morfologice, funcționale și biochimice caracteristice țesutului nervos. O atenție deosebită a fost acordată, în capitolul 5, reînnoirii proteinelor din țesutul nervos și structurilor subcelulare în stările de funcționalitate a organismului (stadiu dinamic, stadiu anabolic), metabolismului proteic în diferitele zone structurale și funcționale ale sistemului nervos, precum și compoziției și eterogenității metabolice a fracțiunilor proteice din creier. Capitolul 6 studiază corelația dintre activitățile metabolice ale proteinelor din creier în diferite stadii funcționale, cum ar fi excitația și inhibiția, stimularea fiziologică, dobîndirea cunoștințelor, hipotermia artificială și hibernarea, efectul inaniției, efecte hormonale, efecte ale substanțelor biologic active și ale medicamentelor psihoactive, efectul radiațiilor ionizante, al stărilor patologice. S-a pus de asemenea un accent deosebit asupra metabolismului proteic din creier în ontogenie (capitolul 7), în care se fac studii asupra structurilor subcelulare și localizării lor regionale în timpul diferitelor stadii ale dezvoltării postnatale (cînd se stabilește compoziția fracțiunilor proteice ale țesutului nervos), asupra schimbărilor survenite în compoziția chimică a fracțiunilor proteice ale țesutului nervos în funcție de vîrstă. Capitolul 8 tratează despre catabolismul proteinelor din țesutul nervos. Se face clasificarea și distribuția enzimelor proteolitice intracelulare (acide și neutre), enzime responsabile de faza catabolică a meta-

bolismului proteic în țesutul nervos. Autorii acordă prioritate cercetărilor proprii referitoare la funcționalitatea biochimică a structurii celulei nervoase. În acest domeniu, atît de fructuos în ultimele două decade, cercetările autorilor ocupă un loc semnificativ. Autorii furnizează și date cronologice asupra progreselor obținute în cercetare, care au contribuit la evoluția concepțiilor prezente, și indică direcțiile de perspectivă în viitor. O vastă bibliografie, mai mult de 1 800 de referenți din literatura mondială de specialitate, completează această atotcuprinzătoare lucrare

Corina Mihail

Environmental Carcinogens — Selected Methods of Analysis. Volume 2: Methods for the Measurement of vinyl chloride in poly (vinyl chloride), air, water and foodstuffs (Substanțe cancerogene din mediul înconjurător — analiza lor. Vol. 2 : Metode pentru determinarea clorurii de vinil în policlorura de vinil, aer, apă și alimente), D. C. M. SQUIRRELL & W. THAIN (ed.), IARC Scientific Publications No. 22, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1978, 142 p.

În introducerea volumului se subliniază că publicarea metodelor de analiză pentru clorura de vinil în mediul înconjurător — apă, aer, alimente — reprezintă una dintre priorități, ca și pentru nitrozamine volatile și hidrocarburi aromatice policiclice. În multe țări a apărut necesitatea unor norme privind nivelele de concentrație acceptate în alimente, apă etc.

În prima secțiune se menționează tipurile de cancer ce apar în experimentele pe animale de laborator, precum și la oamenii din ramurile industriale unde se utilizează clorura de vinil, frecvența cea mai mare avînd-o angiosarcoamele hepatice. Se atrage atenția că această substanță provoacă și leziuni necanceroase, cunoscute ca „sindromul sclerotic".

În secțiunea următoare se trec în revistă tehnicile de determinare și înregistrare a concentrațiilor clorurii de vinil în aer, apă, alimente și polimeri industriali, iar în secțiunea finală aceste tehnici, care se referă mai mult la detectarea și recoltarea probelor din diverse materiale, sînt detaliate. Din punct de vedere chimic se apelează la gaz-cromatografie.

Vl. Gheordunescu

„Topics in Environmental Physiology and Medicine", ed. K. E. SCHAEFER, *The Influence of ocular light Perception on Metabolism in Man and in Animal*, de F. HOLLWICH, Springer-Verlag, New York — Heidelberg — Berlin, 1979, 129 p., 59 fig.

În această carte se strecoară o ușoară tendință popularizatoare, care rezultă nu din scăderea nivelului științific, ci din faptul că mai ales introducerea și istoricul fiecărui capitol beneficiază de o mare toleranță, de o anumită dorință de a respecta sensul profund al noțiunilor și adevărurilor științifice în continua lor perfecționare.

Sînt discutate pe larg anatomia și fiziologia porțiunii energetice a nervului optic, de la retină la hipotalamus, relațiile luminii cu glanda pineală, lumina și creșterea organismului, lumina și temperatura corpului. Lucrarea continuă cu aprecierea influenței luminii asupra funcției renale, asupra cantității de sînge și diferitelor tipuri celulare sanguine și asupra funcțiilor metabolice.

Influența luminii asupra glandelor endocrine este tratată în raport cu funcția tiroidei, funcția sexuală și funcțiile glandelor suprarenale și hipofizei.

Cartea se încheie cu cîteva capitole consacrate diferențelor dintre lumina solară și cea fluorescentă și poluării luminoase. Sînt culese astfel concluziile asupra importanței luminii în metabolismul uman și animal.

Bibliografia (21 pagini), la care se adaugă un index pe autori și un index pe subiecte, încheie lucrarea.

C. C. Prunescu

Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, ed. R. H. ADRIAN et al., vol. 86, Springer-Verlag, Berlin —Heidelberg—New York, 1979, 206 p., 44 fig.

Acest volum cuprinde trei capitole distincte.

Primul capitol trece în revistă rolul fibrelor cardiace de tip C ale nervului vag în controlul cardiovascular. Autorul, Peter Thoren, fiziolog de la Universitatea din Göteborg (Suedia), detaliază morfologia ramurilor cardiace ale nervului vag, caracteristicile terminațiilor cardiopulmonare ale fibrelor C, efectele reflexe ale acestor fibre, rolul lor în controlul ritmului cardiac al circulației periferice și al volumului circulator sanguin. Sînt de asemenea discutate rolul aferentelor cardiopulmonare în controlul circulației sanguine a omului și implicațiile fiziopatologice ale fibrelor C.

Al doilea capitol conține morfologia și fiziologia medulei renale, zonă mai puțin studiată a sistemului excretor. După precizarea domeniului, autorii, R. J. Hogg și Juha P. Kokko, de la Centrul de științe medicale al Universității din Dallas, Texas (S.U.A.), prezintă ultrastructura segmentului subțire al ansei lui Henle, relațiile tubulo-vasculare și histologia epiteliului pelvic. Este de asemenea prezentată fiziologia unor segmente ale nefronului, ca pars recta și ansa lui Henle.

Al treilea capitol informează asupra mecanismelor schimbului de gaze în plămînii păsărilor. Autorul, Peter Scheid, de la Institutul Max Planck pentru medicină experimentală din Göttingen (R. F. Germania), prezintă anatomia plămînilor și a sacilor aerieni, ventilația tractusului respirator, proprietățile sîngelui în transportul gazelor, schimbul parabronhial de gaze la păsările alergătoare, în timpul zborului și în timpul cufundării în apă.

Fiecare capitol se bazează pe o importantă și recentă bibliografie. Cartea se încheie cu indexul pentru autori și un index pe subiecte.

C. C. Prunescu

Prostate Gland and seminal Vesicles, în *Handbuch der microskopischen Anatomie des Menschen*, VII/6, de G. AUMÜLLER, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 380 p., 142 fig.

Această carte, care prezintă anatomia microscopică a prostatei și veziculelor seminale, este scrisă și editată cu rigoare și seriozitate.

Textul, redactat în limba engleză, este împărțit în trei mari capitole. În primul capitol sînt descrise histogeneza și organogeneza acestor organe la om și se dau, de asemenea, elemente de embriologie comparată la șobolan, hamster, cîine etc.

Al doilea capitol prezintă anatomia, histologia, histochimia și numeroase date de ultrastructură ale complexului prostatic la șobolan, cîine și om. Aceste date sînt completate cu morfologia funcțională a epiteliului prostatic, studii *in vitro* asupra celulelor epiteliale, reglarea hormonală și morfologia experimentală a prostatei. Sînt descrise țesutul conjunctiv, musculatura, vasele de sînge și inervația prostatei.

După un plan similar sînt prezentate, în al treilea capitol, veziculele seminale. Structura veziculelor seminale este descrisă detaliat la un mare număr de specii : cobai, șobolan, alte rozătoare, animale domestice, primate și mai ales la om, în condiții fiziologice, experimentale și în unele afecțiuni ale sistemului genital.

Cartea conține 142 de figuri, reprezentate prin desene schematice și reconstituiri, fotografii după preparate histologice și histochimice și mai ales din fotografii electronooptice. Marea majoritate a ilustrației este originală. Toate imaginile sînt de foarte bună calitate.

Sînt integrate și discutate succint cele mai importante date ale literaturii de specialitate pînă în anul 1977 inclusiv.

Volumul se încheie cu un index complet de autori și de subiecte.

C. C. Prunescu

Topics in Current Chemistry (Probleme actuale în chimie), ed. F. L. BOSCHKE, Springer-Verlag, Berlin, vol. 84, 1979, 144 p.

Legătura chimică care a dus la apariția vieții în forma pe care o cunoaștem astăzi este legătura C—C și C—H. Datorită acestei proprietăți a carbonului de a forma legături de tipul arătat, s-au putut forma substanțe organice care intră în majoritatea reacțiilor biochimice ale lumii vii. Deși siliciul este al doilea element ca răspîndire în litosferă după oxigen și face parte tot din grupa a IV-a a sistemului periodic ca și carbonul, structura sa electronică i-a conferit proprietăți fizico-chimice deosebite față de acelea ale carbonului și astfel legături de tipul Si—Si, Si—C sau Si—H nu au fost identificate pînă în prezent în materia vie. Cu toate acestea, se știe că siliciul joacă un rol important în metabolismul plantelor superioare, animalelor și omului, concentrația lui în organism fiind însă foarte mică. Pe de altă parte, pînă la ora actuală majoritatea proceselor biochimice în care este implicat siliciul au rămas necunoscute. Dacă în materia vie nu s-au detectat legături chimice de tipul Si—Si sau Si—C, în schimb substanțe organice avînd astfel de legături au fost sintetizate în laborator. S-a născut deci firesc întrebarea : cum vor reacționa organismele vii dacă sînt puse în contact cu astfel de compuși? Încercările de a răspunde la această întrebare, precum și în scopul studierii efectului biologic al unor astfel de compuși au dus în ultimii 10—15 ani la apariția unui nou domeniu de cercetare, și anume biochimia compușilor organici cu siliciu.

Avînd în vedere rapida dezvoltare a domeniului și importantele implicații teoretice și practice ce rezultă de aici, prezentul volum are meritul de a oferi cititorului o punere la punct asupra principalelor căi de cercetare în chimia, farmacologia și toxicologia compușilor organici cu siliciu. În prima parte a cărții, Tacke și Wannagat prezintă sinteza și proprietățile fizico-chimice a numeroși compuși organosilicici cu și fără analogi în chimia organică. Se discută pe larg efectele biologice ale acestor compuși și posibilitățile de folosire în diferite domenii ale medicinii și agriculturii. În a doua parte a cărții, Voronkov prezintă pe larg activitatea biologică a silatranilor, compuși ciclici conținînd siliciu pentacoordinativ și azot tetracoordinativ. Această clasă de substanțe este de un interes deosebit, întrucît în funcție de radicalul organic legat de atomul de siliciu se pot obține substanțe cu efecte biologice importante din punct de vedere medical. Astfel au fost sintetizați silatrani care au fost folosiți cu succes în tratamentul arsurilor și rănilor, diferitelor forme de alopecie. Unii silatrani au arătat activitate antitumorală și imunostimulatoare. Cercetări recente au demonstrat că silatranii își vor găsi o largă aplicație în terapeutica medicală, agricultură, zootehnie etc. Interesul pentru studiul chimiei compușilor organici cu siliciu va crește fără îndoială și pentru cei atrași de acest domeniu extrem de promițător volumul de față este o binevenită introducere în acest capitol al biochimiei moderne.

Ștefan Hulea

Experimental Hematology Today, 1978 (Hematologie experimentală actuală, 1978), ed. SIEGMUND J. BAUM, G. DAVID LEDNEI, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 251 p., 90 ilustrații.

Hematologia experimentală este un domeniu la care importanța poate fi apreciată prin vîrstă, întrucît, deși hematologia a apărut de mai mult timp, necesitatea ei (atît teoretică cît și practică) nu a avut nici măcar un moment în care să nu se manifeste cu stringență.

Volumul de față își ia sarcina foarte dificilă de a ne prezenta noutățile tocmai în acest domeniu. Chestiunea este cu atît mai delicată cu cît prezentarea a ceea ce este nou nu poate să se facă decît prin prisma legăturii cu achizițiile solide ale domeniului. De aceea, editorii au avut o sarcină deosebit de grea în organizarea materialului. Totuși, ei au izbutit să fie la înălțime, găsind cea mai elocventă formulă de prezentare.

Lucrarea se structurează în principal pe șase direcții, corespunzînd în esență următoarelor chestiuni mai importante :

— reglarea proliferării populațiilor de celule nediferențiate ;
— fiziologia celulelor nediferențiate ;
— imunologia transplantării ;
— abordările terapeutice ale anemiei aplastice ;
— tratamentul leucemiilor ;
— noutăți în hematologia experimentală.

În fiecare din aceste secțiuni sînt prezentate în primul rînd dovezile experimentale, cu definirea exactă a tehnicilor prin care au fost obținute, urmînd apoi o interpretare critică a consecințelor teoretice care se desprind din analiza acestor date.

Interpretarea problemelor de dinamică a populațiilor de celule face obiectul unui minuțios calcul statistic, ceea ce — credem — spune mult despre cuantificarea practicată în acest domeniu. Aspectele imunologice, foarte numeroase de altfel, sînt și ele deosebit de minuțios prezentate. Genetica proceselor hematologice este prezentată la nivelul ultimelor descoperiri. Un loc aparte îl ocupă de asemenea tehnicile histochimice și mai ales interpretarea lor. Volumul este redactat cu multă limpezime și are un excelent index de termeni ; în mare, el este o demonstrație a faptului că un domeniu atît de specializat poate fi de mare interes și atractivitate chiar pentru nespecialiști. Evident, hematologii sînt primii săi beneficiari, dar volumul deschide acestora perspectiva spre o comunicare fructuoasă cu cei de alte specialități.

Mihai Zamfir

Archives of Toxicology, Supplement 2, Mechanism of Toxic Action on Some Target Organs (Mecanismul acțiunii toxice asupra unor organe țintă), ed. P. L. CHAMBERS and P. GUNZEL, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—NewYork, 1979, 523 p., 150 fig.

Lucrările Întrunirii Societății europene de toxicologie, ținută în Berlinul de Vest în perioada 25—28 iunie 1978, fac obiectul celui de-al 2-lea supliment al „Arhivelor pentru toxicologie".

Actuala întrunire își consacră lucrările mecanismului acțiunii toxice a medicamentelor și a altor substanțe asupra unor organe țintă. Aceasta este desigur, printre altele, și o recunoaștere a faptului că efectul toxic presupune numeroși mediatori și procese intermediare, el nemaiputînd fi conceput în stadiul actual al dezvoltării toxicologiei ca un proces imediat. În fond, însăși complexitatea organismului obligă la acest punct de vedere.

Studierea mecanismelor toxice nefiind, prin urmare, o problemă prea simplă, organizatorii s-au văzut în situația de a dirija lucrările întrunirii pe anumite direcții, după cum multe mecanisme puteau admite un tratament comun. Astfel o primă direcție este influența sistemului neuroendocrin asupra reacțiilor toxice datorate hormonilor și altor substanțe. În această privință sînt prezentate influențele toxice atît ale exceselor hormonale, cît și ale altor substanțe care își exercită efectul toxic via hormoni. Se mai prezintă de asemenea efectele toxice ale substanțelor cu structură asemănătoare hormonilor.

O altă direcție privește, așa cum era și firesc, toxicitatea unor substanțe asupra celui care execută cele mai grele detoxifieri : ficatul.

Problema este pusă cu multă seriozitate, prezentarea ei mergînd pînă la fundamentele fiziologice ale organului, a căror dinamică este analizată minuțios în fiecare caz.

Desigur, nu numai ficatul realizează detoxifieri, ceea ce ar fi un fapt de la sine înțeles ; ar mai trebui subliniat felul în care acest lucru se petrece. Editorii au făcut din plin aceasta în capitolul dedicat organotropiei ca fenomen toxicologic, în care cele mai importante organe și sisteme sînt prezentate din punctul de vedere al posibilităților de detoxifiere a diferitelor categorii de substanțe.

În sfîrșit, exceptînd comunicările libere și pe cele ale sesiunii poster, deosebit de interesante și diverse de altfel, este cazul unei mențiuni speciale pentru prezentarea separată și extensivă a problemelor toxicologice aferente accidentului de la Seveso.

Lucrarea este în ansamblul ei densă și de o remarcabilă limpezime, putînd servi în această privință în mod fericit ca model. Ponderea deosebit de mare a elementelor de biochimie și fiziologie o face accesibilă și utilă nu numai toxicologilor, dar în mare măsură biochimiștilor și biologilor.

Mihai Zamfir

Endorphins '78 (Endorfine '78), ed. L. GRAF, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1978, 333 p.

Între 2 și 6 octombrie 1978 a avut loc la Budapesta Conferința internațională de lucru Endorfine '78, un eveniment științific de primă importanță, care s-a bucurat de aprecieri elogioase din partea celor mai reputați specialiști în acest domeniu. Conferința s-a constituit ca un rezultat

firesc al acumulărilor tot mai mari de cunoştinţe în domeniul peptidelor opioide. Se impuneau cu necesitate discutarea unor rezultate, sincronizarea unor puncte de vedere şi, în general, stabilirea printr-un contact direct şi ceva mai amplu a unor viitoare direcţii pe care să fie dirijat viitorul efort de cercetare în domeniu. Materialul deosebit de bogat i-a obligat pe organizatori la o selectare a participărilor şi totodată la publicarea numai a acelor discuţii care s-au dovedit de o acută relevanţă. Pentru o cît mai cuprinzătoare tratare a ansamblului problemelor s-au reţinut următoarele direcţii :

— necesităţi structurale pentru acţiunile analgetice şi de altă natură ale peptidelor opioide ;

— reglarea biosintezei şi eliminării ACTH/endorfină în pituitară şi SNC ;

— nivele tisulare ale peptidelor opioide endogene ; alegerea procedeelor de extracţie care să nu conducă la artefacte ;

— microeterogenitate, origine şi funcţie a encefalinelor ;

— diferite populaţii de receptori opioizi ;

— substanţe opioide endogene în psihiatrie.

Aceste direcţii au fost dezvoltate în cadrul următoarelor secţiuni ale întîlnirii, care constituie totodată şi capitolele de fond ale lucrării de faţă : structură şi funcţie ; biosinteză ; repartizare şi eliberare ; receptori şi funcţiuni ; farmacologie şi aspecte clinice, precum şi o masă rotundă, intitulată în mod semnificativ „Perspective ale studiilor endorfinelor".

Lucrarea prezintă un mare interes în principal din punctul de vedere al neurofiziologiei (mai exact al fiziologiei SNC) şi psihiatriei, dar, prin implicarea din punct de vedere biochimc a unor procese, cum ar fi, de exemplu, proteoliza peptidelor mici, ea atrage o serioasă atenţie asupra necesităţii de a considera acest domeniu cu multă atenţie din punct de vedere biochimic. Participarea unor specialişti de mare valoare la reuniunea prezentată, precum şi aprecierea de care volumul se bucură după apariţie ne îndreptăţesc să afirmăm că ne aflăm în faţa unei lucrări de referinţă, de mare valoare informativă, a cărei studiere este un mare avantaj pentru multe categorii (fiziologi, neurofiziologi, biochimişti, psihiatri etc.).

Mihai Zamfir

Handbook of Sensory Physiology, vol. VII/6 A, *Comparative Physiology and Evolution of Vision in Invertebrates A : Invertebrate Photoreceptors* (Fiziologia comparată şi evoluţia vederii la nevertebrate A : Fotoreceptorii la nevertebrate), ed. HANSJOCHEM AUTRUM, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 729 p., 314 fig.

Volumul de faţă, partea A, care va fi urmată în curînd de partea B, se ocupă în special de fiziologia celulelor fotoreceptoare, tratînd în acelaşi timp şi problemele fiziologiei fotorecepţiei în general la protiste şi nevertebrate. În 12 contribuţii, care reprezintă de fapt cele 12 capitole ale volumului, semnate de reputaţi specialişti în domeniul fotorecepţiei, sînt tratate aspectele biofizice, biochimice, comportamentale şi genetice ale fenomenelor fotorecepţiei la nevertebrate. În multe capitole apar referiri speciale la vertebrate, acolo unde s-a constatat existenţa unor structuri şi funcţii comparabile sau, dimpotrivă, divergente.

Sînt tratate în cîte un capitol următoarele aspecte : fotorecepţia la protiste, filtrele intraoculare, fiziologia pigmenţilor vizuali, biofizica ochilor compuşi, sensibilitatea la polarizare, pseudopupilele ochilor compuşi, sensibilitatea spectrală şi viziunea color, fotoreceptorii extraoculari şi ritmurile nictemerale, aspectele genetice ale sistemului vizual. Fiecare capitol este însoţit de o bibliografie cuprinzătoare.

Lucrarea se adresează cercetătorilor interesaţi în diferitele aspecte ale fenomenului fotorecepţiei, oferind informaţii la zi, consideraţii şi puncte de vedere în problema vederii la nevertebrate. O atenţie specială este acordată problemelor nerezolvate încă şi celor noi care derivă din datele bine stabilite.

În ansamblu, volumul reprezintă o remarcabilă contribuţie la cunoaşterea fiziologiei comparative a nevertebratelor în special şi a animalelor în general.

Eleonora Dincă

Advances in anatomy, embriology and cell biology. Implantation (Progrese în anatomie, embriologie și biologie celulară. Implantare), vol. 53, fasc. 5, de HANS-WERNER DENKER, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1977, 123 p., 35 fig., 16 tabele.

Lucrarea, care constituie teza de docentură a dr. Hans-Werner Denker, are ca subtitlu : „Rolul proteinazelor și blocarea implantării de către inhibitorii proteinazei". În introducere se face un scurt istoric asupra inițiatorilor implantării, asupra problemelor teoretice și practice legate de această tehnică, arătîndu-se în final stadiul actual al cercetărilor și rezultatelor obținute pînă în prezent. În capitolul „Material și metode" se dau principiile experimentale asupra modului de lucru pe animale de laborator. Se face apoi o scurtă trecere în revistă a metodelor folosite, care constau din investigații morfologice, histochimice și biochimice. Capitolul „Rezultate" este exhaustiv, cu un material ilustrativ bogat, constînd din secțiuni de țesuturi la diferite nivele. Acest capitol se împarte, la rîndul lui, în trei părți. Prima parte se ocupă de morfologia implantării normale la iepure și pisică. Partea a doua studiază histochimia și biochimia implantării normale. Se fac studii aprofundate, paralele, la iepure și pisică asupra diferitelor aspecte care se referă la histochimia substanțelor mucoase (glicani) de la interfața dintre embrion și mamă ; de asemenea se fac cercetări enzimatice, histochimice și biochimice asupra stadiilor implantării. Enzimele studiate sînt glicozidazele, aminopeptidazele, endopeptidazele (proteinaze). Sînt arătate și acțiunile de dizolvare a învelișurilor blastocitului de către diferite proteinaze *in vitro* (tripsina, papaina, chimotripsina, pepsina, elastaza, cu acțiune efectivă, exopeptidazele, fără efect în condițiile experimentale date). În partea a treia se dau rezultatele obținute în urma investigațiilor efectuate asupra rolului fiziologic și al reglării proteinazei din blastocite la iepuri, rezultatele experiențelor cu modele de blastocite și ale observațiilor asupra lizei învelișurilor și asupra implantării în cazuri de implantare distropică.

O altă problemă se referă la inhibarea proteinazei din blastocite (blastolemaza) și la inhibarea implantării la iepuri prin aplicarea *in vivo* a inhibitorilor proteinazei. În acest context se citează investigațiile morfologice și histologice asupra proteinazei și asupra implantării distropice după aplicarea intrauterină a inhibitorului sau după injecția de control.

Lucrarea se încheie cu un capitol de „Discuții", o adevărată lucrare în sine, care tratează diferite aspecte, dintre care menționăm pe cele care se referă la concepțiile asupra compoziției chimice a învelișurilor blastocitului și asupra căilor posibile ale degradărilor enzimatice. Un mare accent se pune asupra rolului fiziologic al glicozidazelor și proteazelor în dizolvarea învelișurilor blastocitului și în implantare. De aceea, asupra acestui aspect se insistă mai mult și se fac discuții referitoare la dizolvarea pe cale enzimatică a învelișurilor blastocitului *in vitro*, la rolul endopeptidazelor în această acțiune ; se face caracterizarea biochimică a blastocitului și a proteinazelor din secreția uterină la iepure. În cadrul acțiunii *in vitro* a inhibitorilor proteinazei asupra inhibării dizolvării învelișurilor blastocitului, se studiază chimia și biochimia inhibitorilor și se demonstrează rolul cheie al proteinazelor în implantare. Se fac referiri la endopeptidazele legate de implantare la om și la alte specii de mamifere. În cadrul unui alt aspect se discută despre reglarea fiziologică a procesului de implantare și despre rolul trofoblastului și al endometrului în implantare.

Ultimul aspect, de mare importanță și actualitate, se referă la folosirea posibilă a inhibitorilor proteinazei în inhibarea implantării, ca metodă de control a nașterii.

O vastă listă bibliografică, rînduită alfabetic, și un indice de subiecte încheie această lucrare, valoroasă, atît pentru domeniile de strictă specialitate cît și pentru domeniile adiacente implicate, prin rezultatele obținute și mai ales prin perspectivele ce decurg din ele.

Corina Mihail

H. AMBROSIUS, W. RUDOLPH, *Grundriss der Immunobiologie* (Bazele imunobiologiei), VEB Gustav Fischer-Verlag, Jena, 1978, 443 p., 120 fig., 42 tabele,

Cartea de față reprezintă o cuprinzătoare monografie de imunobiologie, fiind în același timp, prin organizarea și prezentarea materialului, un foarte bun manual pentru domeniul respectiv. Autorii au grupat materialul în 15 capitole, de la bazele moleculare ale imunității pînă la aspecte clinice.

Capitolul I, introductiv, definește noțiunile și conceptele de imunobiologie, fiind prezentate procesele nespecifice de apărare față de cele specifice (imunologice), componența generală a sistemelor imune, imunitatea umorală, imunitatea mediată celular, dezvoltarea filogenetică a mecanismelor imune, evoluția reactivității imunologice.

Capitolul II tratează detaliat procesele nespecifice de apărare, luîndu-se în discuţie factorii umorali activi nespecifici.

Un capitol separat se referă la antigene : biochimia antigenelor simple ; proteine, polizaharide, acizi nucleici ca antigene ; biochimia antigenelor speciale (antigene virale, bacteriene, antigene din celule vegetale) ; semnificaţia biologică a antigenelor ; acţiunea antigenelor la nivel celular : interacţiunea dintre antigene-macrofage, respectiv limfocite ; modificări ale activităţii antigenice.

Capitolul IV tratează probleme ale structurii şi funcţiilor imunoglobulinelor ; sînt prezentate clasele de imunoglobuline la om şi diferite specii de animale, Ig asociate cu membrane, receptori pe limfocite B şi T, filogeneza şi ontogeneza imunoglobulinelor.

Separat sînt tratate teoria reacţiei antigen-anticorp, specificitatea de anticorp, reacţia antigen-anticorp *in vitro*, reacţiile de aglutinare, imunohemoliză, imunocitoliză, bacterioliză, imunoviroliză.

Capitolul VI tratează problemele legării de anticorpi la nivel celular, recunoaşterea nonselfului însoţit de prezentarea sistemelor de celule limfoide şi a funcţiilor lor, heterogenitatea limfocitelor şi prezentarea ţesuturilor şi organelor limfatice.

Capitolul VII ia în discuţie baza biochimică a formării anticorpilor : locul şi inducerea sintezei Ig, sinteza componentei proteice respectiv de carbohidrat, reglarea sintezei, sinteza în răspunsul primar şi secundar, teorii referitoare la sinteză şi selecţie, turnoverul imunoglobulinelor.

Un capitol separat este consacrat imunologiei nou-născutului, fiind luate în discuţie problemele ontogenezei răspunsului imun, ontogenezei formării Ig, maturizării imunologice, transferului de anticorpi de la mamă (diaplacental, colostral).

Capitolul IX se referă la aspectele de imunitate în apărarea contra infecţiilor ; este prezentată semnificaţia reacţiei imune în apărarea contra infecţiilor (în bacterioză, parazitoză, viroză) cu limite ale imunizării. În următorul capitol sînt prezentate bazele imunităţii mediate celular.

Un capitol aparte se referă la reacţiile alergice : reacţii anafilactice, mediatorii lor, reacţii citotoxice mijlocite de anticorpi, reacţii alergice prin complexe imune, hipersensibilitate întîrziată. Autoimunitatea şi bolile autoimune fac din nou obiectul unui capitol separat, fiind prezentate originea autoimunităţii şi mecanismele celulare ale agresiunii autoimune.

Următoarele două capitole se referă la imunotoleranţă, imunologia transplantelor şi tumorilor, rejecţiei, toleranţa la transplant şi imunologia tumorilor la om (diagnostic şi terapie). Capitolul final al cărţii se referă la imunosupresie, specificitatea sa, imunosupresie fizică, chimică, biologică, limitele imunosupresiei.

Cartea, bogat documentată şi ilustrată, cu literatura la zi, poate fi utilă atît cercetătorilor din domeniu, cît şi studenţilor în biologie şi biochimie.

Gabriela Angel

K. H. BÄSSLER, W. FEKL, K. LANG, *Grundbegriffe der Ernährungslehre* (Noţiuni de bază ale nutriţiei), ed. a 3-a revăzută şi lărgită, Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1979, 200 p., 16 fig., 68 tabele.

Cartea cuprinde problemele importante ale nutriţiei umane, căreia în ultimii ani i se acordă o deosebită importanţă, alimentaţia raţională avînd mari implicaţii în zilele noastre atît în ţările dezvoltate, cît mai ales în cele subdezvoltate, în medicina profilactică şi în terapeutică.

Materialul este sistematizat în 12 capitole, cu numeroase subcapitole, cu indicaţii bibliografice la fiecare capitol, precum şi cu un capitol special de recomandări de bibliografie privind introducerea în biochimie, biochimia nutriţiei şi necesarul în alimente.

Principalele capitole se referă la : digestie şi resorbţie, aspectele cantitative şi calitative ale nutriţiei, componentele hranei şi adaosurile cu acţiune diferenţiată, modificarea alimentelor prin pregătire şi prelucrare, recomandări cu privire la calitatea şi compoziţia hranei, alimentaţia greşită drept cauză a îmbolnăvirilor, dieta şi forme speciale de alimentaţie, fiziologia şi patofiziologia metabolismului în starea de foame, metabolismul în stress şi probleme de viitor ale alimentaţiei.

Faţă de ediţiile precedente, această ediţie, mult îmbunătăţită şi reactualizată, cuprinde o serie de capitole noi. Se tratează problema tot mai actuală şi discutată a substanţelor de balast, aspectele legate de malnutriţie, metabolismul în condiţiile de stress, îmbolnăvirile datorate unei alimentaţii greşite etc.

Cartea se adresează biochimiștilor, medicilor, celor care lucrează în industria alimentară etc., fiind un bun ghid pentru toți cei preocupați de problemele unei alimentații raționale.

Sorin Vasu

L. SACHS, *Statistische Methoden* (Metode statistice), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg — New York, 1979, 105 p., 5 fig., 26 tabele.

Volumul reprezintă ediția a 4-a îmbunătățită a *Metodelor statistice* de L. Sachs. Cartea, împărțită în 9 capitole, prezintă metodele simple de calcul statistic, de uzanță largă în chimie, biologie, medicină.

Capitolul 1 conține definiții și precizări în legătură cu noțiunile și metodele de statistică.

Capitolul 2 prezintă metodele de calcul pentru valori medii (medie geometrică, medie armonică), varianță, coeficientul relativ de varianță, eroarea standard a mediei variantei.

În capitolele 3 și 4 sînt discutate semnificația distribuției de frecvență și a distribuției normale.

În capitolul 5 sînt discutate semnificația și modul de calcul al domeniului de încredere pentru valoarea medie, mediană, varianță, abatere standard.

Capitolul 6 prezintă cîteva teste statistice : F, t, x^2.

Numărul minim de observații necesare pentru a aplica o anumită metodă variază în funcție de o serie de factori ; o discuție referitoare la acestea este prezentată în capitolul 7.

Problemele de corelație și regresie sînt discutate în capitolul 8.

Capitolul 9 dă metode rapide de comparație a unor valori medii.

Definițiile sînt foarte clare ; fiecare metodă de calcul, aproape fiecare afirmație este exemplificată, așa încît cartea este de mare ajutor și pentru cititorul mai puțin familiarizat cu problemele de statistică. Foarte utile sînt și considerațiile finale ale autorului cu privire la modalitățile de prezentare a rezultatelor.

Sînt puține cazurile care necesită o prelucrare statistică prin vreo metodă mai complicată decît cele prezentate în această carte ; altfel spus, cartea conține informația necesară cu privire la metodele statistice cele mai simple și în același timp cel mai larg utilizate.

Gabriela Angel

E. SCHWARZ,H.W. SPIER, G. STÜTTGEN, *Normale und Pathologische Physiologie der Haut. II* (Fiziologia normală și patologică a pielii. II), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg— New York, 1979, 606 p., 196 fig.

Prezentul volum din seria tratatelor de boli ale pielii apare ca o completare a volumelor apărute pînă în prezent în seria respectivă. În acest volum (secțiunea A din partea a IV-a a seriei I) sînt tratate problemele de structură și funcție a pielii din punctul de vedere al dezvoltării stratului superficial al pielii, precum și al multiplelor sale funcții biochimice și fiziologice. Stratul superficial al pielii este tratat ca o unitate funcțională distinctă.

Capitolul 1 prezintă biochimia cheratinizării patologice (structuri epidermale macromoleculare, lipidele și cheratinizarea, cercetări de biologie moleculară ale cheratinizării, filogeneza cheratinizării).

Capitolul 2 conține o discuție referitoare la reglatori ai ciclului celular epidermal (reglarea proliferării și diferențierii, reglarea ciclului celular epidermal în general, psoriasis—caz patologic).

Următorul capitol se referă la bazele fiziologice ale funcționării stratului cheratinos.

Un vast capitol este consacrat prezentării lipidelor din stratul superficial al pielii (nomenclatură, compoziție, metode de analiză, modificări compoziționale și cantitative în diferite condiții fiziologice, modificări în dermatoze). Capitolul 5 tratează probleme de neurofiziologie și patofiziologie a secreției sudoripare (anatomia și fiziologia inervării glandelor sudoripare, neurofiziologia secreției sudoripare, metode clinice de observare, tulburări ale secreției sudoripare).

Ultimul capitol al cărții tratează probleme de fotobiologie cu discutarea detaliată a efectelor primare și secundare ale luminii asupra pielii, efecte la nivel molecular, la nivel tisular, efecte întîrziate ale expunerii cronice la lumină, fotoreacții sensibilizate.

Tratînd și aspectele legate de impactul energetic luminos asupra pielii, cartea se prezintă ca un tratat foarte cuprinzător referitor la stratul superficial al pielii. Pielea, „granița" dintre organism și lumea înconjurătoare, cu numeroase funcții de reglare și apărare, este tratată ca un „organ" distinct, propriu abordării de către biologia moleculară.

În ceea ce privește tratarea problemei, grație înțelegerii ce i-o dau autorii, dispar granițele dintre medicină, fiziologie, biochimie.

Lucrarea poate constitui un model de tratat de medicină modernă, care valorifică în înțelegerea problemelor chimice datele de biologie moleculară, biochimie.

Gabriela Angel

W. D. ARNOLD, U. LANGEHEINE, *Temperatureffekte an chirurgischen Metallimplantaten bei den gebräuchlichen Elektrotherapieverfahren* (Efecte termice asupra implantelor chirurgice metalice datorită metodelor electroterapeutice uzuale), VEB Georg Thieme, Leipzig, 1979, 64 p., 28 fig., 5 tabele.

Lucrarea reprezintă volumul 24 din seria „Progrese ale biofizicii experimentale și teoretice". Lucrarea se referă la o problemă puțin studiată, devenită actuală prin răspîndirea implantelor metalice în ortopedia fracturilor, osteotomii de corectură, respectiv utilizarea terapiilor de electrofiziologie în tratamentul și în reabilitarea acestor cazuri.

Un capitol special este consacrat metodei de cercetare și problemelor tehnice legate de aceasta. Capitolele 3—5 se referă la evidențierea efectelor termice la nivelul implantelor metalice în condițiile tratamentului cu ultrasunete, cîmp de frecvență înaltă, curent de excitație, microunde. De fiecare dată sînt prezentate sumar baza fenomenologică a procedeului terapeutic luat în discuție, fenomenele care pot duce la efecte termice, rezultate experimentale privind încălzirea implantelor metalice, efecte biologice ale încălzirii.

Cartea se încheie cu un capitol de concluzii în care sînt comparate metodele de electrofiziologie din punctul de vedere al efectelor termice pe care le produc la nivelul implantelor metalice, în funcție de poziția acestora, țesuturi aflate în vecinătate.

Pînă la răspîndirea metodei prezentate în această carte, măsurătorile termice se efectuau pe modele, respectiv țesuturi moarte, în care lipsește funcția de transport termic al sîngelui și al celorlalte lichide din organism. Cartea, pe lîngă faptul că face publică o metodă operativă de investigare *in situ* a implantelor, oferă o bogată informație cu privire la efectele tisulare ale metodelor de terapie electrofiziologică.

Gabriela Angel

E. THENIUS, *Meere und Länder im Wechsel der Zeiten* (Mările și uscaturile în decursul timpurilor), Colecția „Verständliche Wissenschaft", Springer-Verlag, Berlin, 1977, 200 p.

Scopul principal al cărții este de a furniza date privitoare la concepțiile actuale asupra evoluției paleogeografice a globului, în vederea explicării istorice a răspîndirii plantelor și animalelor. Este un compendiu rezumativ de paleogeografie și paleobiogeografie, bazat pe teoria translației continentelor în formă modernă și pe geologia în plăci. Capitolele pur paleogeografice alternează cu cele de biogeografie, pornindu-se de la datele clasice și sfîrșind cu concepțiile moderne. Unul dintre cele mai interesante capitole, al 5-lea, explică, pe înțelesul nespecialiștilor concepțiile moderne de drift continental, inclusiv argumentația paleomagnetică, geologia înplăci și expansiunea fundului oceanelor. Capitolul următor tratează evoluția în timp a oceanelor actuale, iar un altul oceanele și unele mări din trecutul geologic, inclusiv Tethysul și Paratethysul. Un capitol special tratează anumite lacuri : din Europa Marea Sarmatică și cea Pontiană, fără a se arăta derivația lor din Paratethys și nici supraviețuirea în resturile lor a unor specii de origine marină complet adaptate la apa dulce. Se mai discută două lacuri din zone deșertice

(Bonneville în S.U.A., Callabonna în Australia) și lacurile africane ; Baikalul, Ohrida nu sînt amintite. Glaciațiunile precuaternare sînt puse în legătură cu deplasarea polilor. Un capitol aparte tratează formarea lanțurilor muntoase în lumina geologiei în plăci, punîndu-se în contrast munții de tip himalaian (rezultați prin ciocnirea a două plăci continentale), de tip cordilier (rezultați prin subducția unei plăci marine sub una continentală) și de tip alpin (origine complexă). Florelor și faunelor terestre, cu explicația istorică a genezei lor, li se acordă mai puțin spațiu decît celor marine. Textul este însoțit de reconstrucții paleogeografice, bazate pe driftul continental ; în toate se acordă atenție mai ales grupării continentelor sudice, Australia figurînd în toate perioadele la mare distanță de estul Asiei. Probleme ale unor vechi relații între Australia, Indonezia și Asia estică, care rezultă din răspîndirea a destul de numeroși taxoni, se pare că au scăpat total din atenția autorului.

Meritul cărții este de a fi, după cunoștințele noastre, prima paleogeografie și paleobiogeografie bazată pe translația continentelor și geologia în plăci.

Petru Bănărescu

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție: 78171 București 2, P. O. B. 1002.

1980 JUN 9 7

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

D. A. ABRAHAM, *Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi*, 1975, 184 p., 13 lei.

S. OERIU, I. OERIU, *Grupările tiolice și rolul lor în biologie*, 1977, 332 p., 31 lei.

ELENA GABRIELESCU, *Neuroproteazele*, 1978, 157 p., 22 lei.

C. TAȘCĂ, *Histopatologia tiroidei*, 1978, 159 p., 20 lei.

IOANA MILCU, LYDIA NANU, *Glanda pineală ca organ metabolic*, 1979, 190 p., 9,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 23, NR. 1, P. 1—120, BUCUREȘTI, IANUARIE — IUNIE 1980

I. P. I. cd. 2143

43816

Lei 20

F1330 66

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 23

1980

IULIE — DECEMBRIE

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 23, nr. 2, p. 121 — 240, 1980, Bucureşti

SCBIAS—23 (2), (1980)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

CECILIA MOTAȘ

Revista apare de 2 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 40 de lei.

În țară, abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Cititorii din străinătate se pot abona adresîndu-se la ILEXIM, Departamentul Export-Import Presă, P.O. Box 136—137, telex 11226, 79517 — București, str. 13 Decembrie nr. 3.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, P.O. Box 2—2, 78200 — București 2, România.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, Calea Victoriei nr. 125, sectorul 1, cod 79717

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tomul 23, nr. 2 1980

IULIE – DECEMBRIE

SUMAR

SIMONA CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU, Determinarea glucidelor în unele polenuri monoflore de pe teritoriul României, culese de *Apis melifica carpatica* 123

SIMONA COFARU, AL. VRĂBIESCU, Glicoproteinele de structură din mușchiul de șobolan în senescență și sub tratamentul cu gerovital H_3 127

V. DARIE, M. ŞERBAN, Variația aminoacizilor liberi din plasma sanguină și ficat în diabetul aloxanic 135

MARIA-LUIZA FLONTA, D.-G. MĂRGINEANU, Efectul glutaraldehidei asupra permeabilităților osmotice și difuzionale ale vezicii urinare de broască . . 141

ELENA GANEA, SABINA GHEORGHE, S. A. HULEA, Comportarea la diferite pH-uri a proteazelor obținute la separarea prin gelfiltrare a extractului lizozomal din ficatul de șobolan 147

SILVIA INDREI, V. GHEORGHE, GABRIELA ANGEL, Fracționarea izoelectrică a colagenului acido-solubil 153

VALENTINA JURCA, ANETA SILICĂ, Acțiunea ionilor de litiu, sodiu și potasiu asupra fosfatazei alcaline și fosfatazei acide din diferite țesuturi și organe 161

VICTORIA PITULICE, C. BOGDAN, Modificările patologice ale unor proteine plasmatice în hepatopatiile cronice 169

C. RABEGA, SIMONA BOTEA, MARIA RABEGA, Curba de tranziție viscozimetrică, indice al modificărilor suferite de cromatină în urma tratamentului cu carcinogeni 177

H. D. SCHELL, IRINA CORNOIU, Obținerea și proprietățile catalitice ale invertazei imobilizate pe agaroză activată cu BrCN 183

M. TĂMAŞ, EM. FĂGĂRĂŞANU, L. POP, Taxoni chimici infraspecifici de *Chrysanthemum balsamita* L. *(Asteraceae)* 191

S. VASU, S. A. HULEA, MAGDALENA LUNGU, Distribuția intracelulară și formele moleculare multiple ale DN-azelor în timpul dezvoltării fungului *Aspergillus niger* 195

M. ZAMFIR, Determinarea proteinelor prin metoda Lowry în prezența acidului boric 201

M. ZAMFIR, S. VASU, Producerea celulazelor de către *Aspergillus niger* cultivat pe medii de cultură naturale (subproduse și deșeuri ale industriei alimentare) 209

REFERAT GENERAL

DOINA POPOV, Sinteza proteinelor la eucariote 217

RECENZII 233

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

B I O C H I M I E

Tome 23, n° 2 1980

JULY — DECEMBER

CONTENTS

SIMONA CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU, Glucides determination in certain monoflower pollens from Romania harvested by *Apis melifica carpatica* . . 123

SIMONA COFARU, AL. VRĂBIESCU, Structure glycoproteins from the rat muscle in senescence and under the effect of Gerovital H_3 treatment 127

V. DARIE, M. ŞERBAN, The variation of the total amount of free amino acids from the blood plasma and liver in the experimental diabetes 135

MARIA-LUIZA FLONTA, D.-G. MĂRGINEANU, Glutaraldehyde effect on the osmotic and diffusional permeabilities of the frog urinary bladder . . . 141

ELENA GANEA, SABINA GHEORGHE, S. A. HULEA, The pH influence on the proteolytic enzymes obtained by gel filtration of rat liver lysosomal extract 147

SILVIA INDREI, V. GHEORGHE, GABRIELA ANGEL, Isoelectric fractionation of acid soluble collagen 153

VALENTINA JURCA, ANETA SILICĂ, The effect of Li^+, Na^+ and K^+ ions on alkaline and acid phosphatase from different tissues and organs 161

VICTORIA PITULICE, C. BOGDAN, Pathological changes of some proteins in chronic plasmatical hepatitis 169

C. RABEGA, SIMONA BOTEA, MARIA RABE..A, Thermal transition curve — a detection way of the carcinogen-induced alteration at the chromatin level 177

H. D. SCHELL, IRINA CORNOIU, Herstellung und katalytische eigenschaften der an BrCN-aktivierte agarose gebundenen invertase 183

M. TĂMAŞ, EM. FĂGĂRĂŞANU, L. POP, Infraspecific chemical taxa of *Chrysanthemum balsamita* L. *(Asteraceae)* 191

S. VASU, S. A. HULEA, MAGDALENA LUNGU, Intracellular distribution and the multiple molecular forms of DN-ase during the growth of the fungus : *Aspergillus niger* 195

M. ZAMFIR, The determination of proteins by the Lowry method in the presence of boric acid 201

M. ZAMFIR, S. VASU, Production of cellulases by *Aspergillus niger* grown on natural culture media (by-products and wastes from food industry) 209

GENERAL REVIEW

DOINA POPOV, Protein synthesis in eukaryotic cells 217

REVIEWS 233

DETERMINAREA GLUCIDELOR ÎN UNELE POLENURI MONOFLORE DE PE TERITORIUL ROMÂNIEI, CULESE DE *APIS MELIFICA CARPATICA*

SIMONA CEAUŞESCU, N. STĂNCIOIU

Rezumat. În polenul monoflor cules separat de albine *(Apis melifica carpatica)* din florile plantelor de *Tiliaceae, Juglandaceae, Compositae şi Ranunculaceae* cultivate în România au fost identificate cinci glucide (rafinoza, zaharoza, glucoza, fructoza şi arabinoza) şi dozate patru dintre acestea (zaharoza, glucoza, fructoza şi arabinoza). Rezultatele determinărilor cantitative arată că nivelul glucidelor dozate este mai mic în polenul de *Juglandaceae* decît în celelalte feluri de polen. În toate speciile de polen cercetat, zaharoza a înregistrat nivelul cel mai scăzut, urmînd, în ordine, glucoza, fructoza şi arabinoza.

În cele mai multe specii de polen, hidraţii de carbon reprezintă componentul principal. Polizaharidele, şi în special amidonul, reprezintă circa 50% din substanţa uscată. În grăuntele de polen matur, aceste glucide se găsesc localizate în intimă (1), (2). Unii cercetători, ca Todd şi Bretherich (1942), Lunden (1954), Nielsen (1955), Watanabe şi Motomura (1961) (citaţi de (3)), au identificat în polenul cules de albine mai multe zaharuri reducătoare, reprezentînd circa 30% din substanţa uscată. Aceşti cercetători susţin că o parte din glucidele simple provin din mierea şi nectarul de pe picioarele albinelor, folosite la legarea granulelor de polen şi la fixarea lui în fagure. Concentraţia lor variază în funcţie de specie şi de condiţiile de recoltare a polenului (4).

Datorită conţinutului ridicat în glucide şi în substanţe biologic-active, polenul este apreciat astăzi tot mai mult în terapia modernă, studiul lui luînd o extindere mai mare în ultimii ani (5), (6), (7), (8).

În lucrarea de faţă s-au pus în evidenţă şi s-au dozat glucidele din polenurile monoflore recoltate de albine din florile plantelor unor familii cultivate pe suprafaţă mare la noi în ţară.

MATERIAL ŞI METODĂ

Ca material de cercetat s-a folosit polen monoflor recoltat de albine din florile plantelor aparţinînd familiilor *Tiliaceae, Juglandaceae, Compositae* şi *Ranunculaceae*. Cele patru feluri de polen au fost furnizate de Apimondia. Polenul a fost mojarat, iar glucidele extrase în alcool etilic 70%, supuse la evaporare la sec şi reluate în alcool izopropilic 10%. Separarea glucidelor din soluţia obţinută s-a făcut prin metoda cromatografiei pe hîrtie, folosindu-se ca sistem de solvenţi alcool butilic — acid acetic — apă (10 : 3 : 3). Glucidele separate au fost identificate cu ajutorul unui amestec preparat din soluţiile 4% difenilamină, 4% anilină în etanol şi 85% acid fosforic în proporţie de 5 : 5 : 1. Dozarea s-a făcut prin eluare în reactiv antronic şi prin măsurarea la spectrofotometru a intensităţii culorii obţinute. Pentru calculul cantitativ au fost folosite curbele etalon ale soluţiilor standard alcătuite din zaharurile respective.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În mod constant, în toate cele patru probe din polenul analizat a fost semnalată prezența a cinci zaharuri simple, și anume rafinoza, zaharoza, glucoza, fructoza și arabinoza.

În tabela 1 prezentăm rezultatele dozării cantitative a patru glucide din cele cinci identificate, și anume zaharoza, glucoza, fructoza și arabinoza. Din datele obținute s-a alcătuit o diagramă, prezentată în figura 1.

Tabela 1

Variația cantitativă a glucidelor din polenul cules de albine (*Apis melifica carpatica*) din plante aparținînd la familii diferite

Nr. crt.	Familia	Glucide (g%)			
		zaharoză	glucoză	fructoză	arabinoză
1	*Tiliaceae*	0,2	0,3	0,5	0,5
2	*Juglandaceae*	0,1	0,16	0,4	0,4
3	*Compositae*	0,2	0,3	0,5	0,5
4	*Ranunculaceae*	0,1	0,3	0,4	0,4

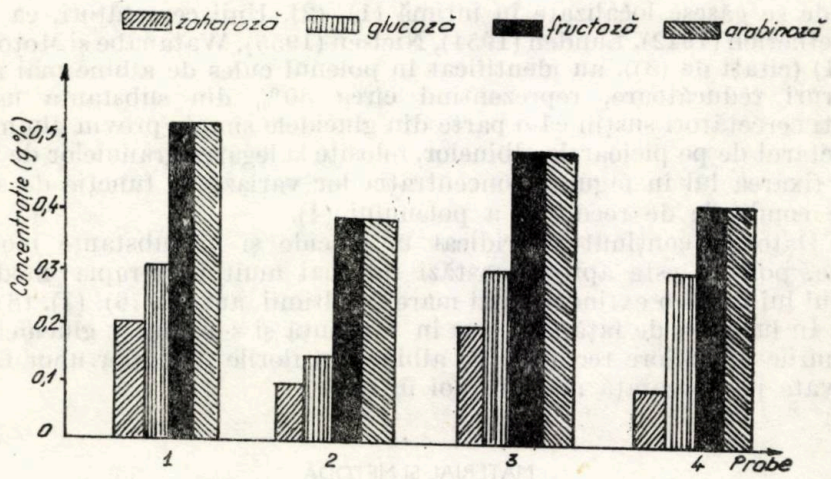


Fig. 1. — Concentrația glucidelor în diferite polenuri din țara noastră : 1, *Tiliaceae*; 2, *Juglandaceae*; 3, *Compositae*; 4, *Ranunculaceae*.

Atît din tabel, cît și din figură se constată că variația concentrației glucidelor în probele analizate are loc în limite restrînse. Variația înregistrată poate fi considerată ca o particularitate a compoziției biochimice a plantelor din familiile respective. În polenul de *Juglandaceae* s-a găsit nivelul cel mai scăzut de glucide în comparație cu celelalte polenuri. În toate speciile de polen, zaharoza a fost întîlnită în concentrația cea mai mică, urmînd, în ordine crescîndă, glucoza, fructoza și arabinoza.

CONCLUZII

1. În polenul monoflor cules de albine din flori de *Tiliaceae*, *Juglandaceae*, *Compositae* și *Ranunculaceae* de pe teritoriul României au fost identificate cinci glucide (rafinoza, zaharoza, glucoza, fructoza și arabinoza) și dozate patru dintre ele (zaharoza, glucoza, fructoza și arabinoza).

2. În polenul de *Juglandaceae*, cantitatea de glucide a fost mai mică decît în celelalte polenuri.

3. În toate speciile de polen, zaharoza s-a găsit în cantitatea cea mai mică; în ordine crescîndă, urmează glucoza, fructoza și arabinoza.

Prezentat la redacție
la 7 februarie 1980

Facultatea de biologie, București,
Disciplina de biochimie
și
Facultatea de medicină veterinară, București,
Disciplina de fiziologie animală

GLUCIDES DETERMINATION IN CERTAIN MONOFLOWER POLLENS FROM ROMANIA HARVESTED BY *APIS MELIFICA CARPATICA*

SUMMARY

In the monoflower pollen harvested by bees *(Apis melifica carpatica)* from the flowers of *Tiliaceae*, *Juglandaceae*, *Compositae* and *Ranunculaceae* plants cultured in Romania, five glucides (raffinose, saccharose, glucose, fructose and arabinose) were identified and four of them (saccharose, glucose, fructose and arabinose) were dosed.

The results of quantitative determinations show that the level of the dosed glucides is smaller in the pollen of *Juglandaceae* than in the other pollen species. In all species of pollen investigated, saccharose showed the lowest level, followed by glucose, fructose and arabinose.

BIBLIOGRAFIE

1. F. Roland, Grana, **11**, *101*, 135—136 (1974).
2. D. Southworth, J. Histochem. Cytochem., **21**, *73*, 135—136 (1973).
3. M. Ialomițeanu, *Polenul*, Edit. Apimondia, București, 1978.
4. R. G. Stanley, H. F. Linskens, *Pollen. Biology, Biochemistry, Management*, Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1974.
5. V. Cîrnu, H. Slușanschi, Lucr. științ. SCCAS, vol. VII, București, 1966.
6. V. Cîrnu, *Plante melifere*, Edit. Ceres, București, 1972.
7. V. Drăghie, Nadia Nicolau, M. Ialomițeanu, *Al II-lea Simpozion internațional de apiterapie*, București, 1976.
8. * * * *Valoarea dietetică a polenului*, Edit. Apimondia, București, 1977.

GLICOPROTEINELE DE STRUCTURĂ DIN MUŞCHIUL DE ŞOBOLAN ÎN SENESCENŢĂ ŞI SUB TRATAMENTUL CU GEROVITAL H_3

SIMONA COFARU, AL. VRĂBIESCU

Rezumat. În extractul brut de glicoproteine de structură din muşchiul coapsei membrelor posterioare de şobolan tînăr (2—3 luni), adult (6—8 luni), bătrîn (22—24 luni) şi bătrîn tratat cu Gerovital H_3 s-au determinat conţinutul de proteine, hexoze totale şi acid sialic, precum şi proteinele solubile din ţesutul muscular. Nivelul de glicoproteine de structură, hexoze totale şi acid sialic scade cu vîrsta ; asemănător scade şi conţinutul proteinelor solubile. La animalele bătrîne tratate, valorile obţinute sînt mai ridicate faţă de lotul de control, tinzînd către valorile găsite la animalele adulte. Rezultatele noastre indică astfel efectul pozitiv de întîrziere a scăderii nivelelor observate la şobolanii în vîrstă datorită tratamentului cu Gerovital H_3.

În ultimii ani s-au publicat numeroase studii asupra diferitelor aspecte ale îmbătrînirii ţesutului conjunctiv, dar se cunosc foarte puţine lucruri despre mecanismele care determină îmbătrînirea în special a elementelor fibroase (glicoproteinele de structură, colagenul, elastina) la nivel celular şi molecular (1).

Glicoproteinele de structură (GPS) reprezintă o clasă de macromolecule, care, împreună cu colagenul, elastina şi proteoglicanii, alcătuiesc matricea intercelulară (MI) a ţesuturilor conjunctive ce se modifică continuu în decursul vieţii. Raportul dintre GPS şi celelalte proteine fibroase ale MI variază de la un ţesut conjunctiv la altul, modificîndu-se pentru acelaşi ţesut de-a lungul ontogenezei. Aceasta poate fi considerată o caracteristică moleculară a diferenţierii celulare a mezenchimului (2).

Bogăţia în GPS a ţesuturilor tinere pledează pentru rolul important al acestor macromolecule în delimitarea celulară, în organizarea şi stabilizarea de macromolecule, ca elastină, colagen din MI. O scădere pronunţată a nivelului GPS din ţesuturi, datorită vîrstei înaintate sau unor factori patologici, are ca urmare modificarea integrităţii tisulare, cu pierderea treptată a troficităţii.

Înalta imunogenicitate a GPS (3) suscită interes în imunopatologie (4). Astfel, GPS din MI sînt implicate şi în fenomene de pierdere a capacităţii de autodiscriminare în sistemul imunocompetent îmbătrînit (5).

Date din literatură indică modificări biochimice la nivelul GPS din tendonul cozii de şobolan în timpul îmbătrînirii (6). De asemenea, s-au arătat scăderea nivelului de GPS în aorta ateromatoasă (7) şi rolul GPS în ateromatoza produsă imunologic (3).

Avînd în vedere rolul biologic al GPS în MI a ţesutului conjunctiv, ne-am propus să efectuăm un studiu biochimic al extractului brut de

GPS din muşchiul de şobolan în funcţie de vîrstă. De asemenea, cunoscînd efectul eutrofizant produs de Gerovital H_3 (GH_3) şi acţiunea sa la nivelul ţesutului conjunctiv, arătată de A. Aslan şi colab. (8), am studiat influenţa tratamentului asupra GPS din MI.

MATERIALE ŞI METODE

Lucrarea s-a efectuat pe 4 loturi de şobolani albi, Wistar, masculi : tineri (2—3 luni) adulţi (6—8 luni), bătrîni (22—24 luni) şi bătrîni trataţi cu GH_3 ; fiecare lot a fost constituit din cîte 10 animale. Tratamentul cu GH_3 s-a aplicat de la vîrsta de 9 luni după următoarea schemă : 10 serii a cîte 12 injecţii intramusculare timp de 4 săptămîni — 3 injecţii pe săptămînă — cu 10 zile pauză între serii. La fiecare injectare s-au introdus 4 mg procaină/kg corp. Muşchiul coapsei membrelor posterioare de şobolan a fost recoltat pe gheaţă şi folosit imediat pentru extracţia GPS după metoda dată de B. Robert şi colab. (1963), modificată de M. Moczar şi L. Robert (9). Metoda a fost adaptată condiţiilor noastre de lucru, aşa cum este prezentată în figura 1, indicîndu-se cele patru etape principale ale metodei de izolare a GPS din muşchi :

I. S-a lucrat pe cîte 7 g de ţesut muscular proaspăt, spălat cu ser fiziologic, fragmentat şi mojarat. S-au adăugat cîte 50 ml acetonă şi butanol, succesiv, agitîndu-se 12 ore la 4° C.

II. Fragmentele de ţesut delipidizate au fost spălate cu apă, centrifugate (9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C) şi supuse extracţiei cu 30 ml tampon, care conţine 1 M $CaCl_2$, 0,5 M Tris şi 0,02 M acid citric la pH 7,5 (tampon CTC). Suspensia de ţesut omogenizat a fost agitată 8 ore la 4° C, apoi centrifugată (9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C). Extracţia în tampon CTC a fost repetată de două ori, cele două supernatante reunite reprezentînd extractul CTC. Sedimentul rămas a fost spălat de două ori în apă pentru îndepărtarea sărurilor de calciu.

III. După spălare şi centrifugare (9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C) s-au adăugat cîte 25 ml apă şi s-au încălzit pe baie de apă pînă la 90° C. Suspensiei i s-a adăugat acid tricloracetic (TCA) 100% pînă la concentraţia finală de 2,7%. După 5 min de agitare puternică la 90° C, suspensia s-a răcit şi s-a centrifugat la 9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C. Reziduul a fost retratat cu 25 ml TCA 2,7%, agitat 25 min la 90° C, răcit, centrifugat (9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C). O ultimă etapă de extracţie cu 2,7% TCA a sedimentului obţinut anterior s-a făcut timp de 30 min la 90° C.

IV. Sedimentul insolubil în TCA 2,7% a fost spălat cu apă, omogenizat în 50 ml soluţie uree 8 M şi agitat 24 de ore la temperatura camerei. După centrifugare (9000 rotaţii/min, 30 min, la 4° C) s-au făcut trei extracţii cu uree, ultima soluţie de uree conţinînd 0,1 M mercaptoetanol (Me) pentru accelerarea extracţiei. Cele trei supernatante reunite au fost dializate contra apă curentă şi apoi contra apă distilată şi reprezintă extractul brut de GPS din muşchi.

Extracţiile de GPS pentru loturile de şobolani (tineri şi bătrîni, bătrîni şi bătrîni trataţi cu GH_3) au fost lucrate în paralel. Fiecare probă a provenit de la două animale.

Metodele analitice utilizate au fost : pentru proteine, metoda Lowry şi colab. (10) cu standard de albumină serică bovină (Sigma) ; pentru hexoze totale, metoda cu orcinol—H_2SO_4 (11) cu standard de galactoză-D (Carlo-Elba) după hidroliza acidă cu 1 N HCl, 6 ore, la fierbere, în fiole închise ; pentru acidul sialic, metoda cu acid tiobarbituric a lui Warren (1959), modificată de Aminoff (12) după hidroliza cu 0,1 N H_2SO_4, 1 oră la 80° C.

Tabela 1

Conţinutul de proteine al extractelor CTC din muşchiul de şobolan pe loturi de vîrstă şi la animalele tratate cu GH_3

Lot animale	Proteină în extract CTC (mg/g ţesut umed)
Tineri	34,28±1,41
Adulţi	25,56±3,80
Bătrîni	24,02±2,55
Bătrîni + GH_3	24,94±1,42

Notă. Numărul de experienţe efectuate = 5.

REZULTATE

Se observă scăderea conţinutului proteinelor în extractele CTC la animalele adulte şi bătrîne, comparativ cu cele tinere; valorile pentru lotul de animale bătrîne tratate cu GH_3 sînt mai crescute decît la lotul de control, apropiindu-se de cele obţinute pentru şobolanii adulţi (tabela 1).

Valorile pentru proteine, hexoze totale şi acid sialic scad cu vîrsta în muşchiul de şobolan (tabela 2) la lotul

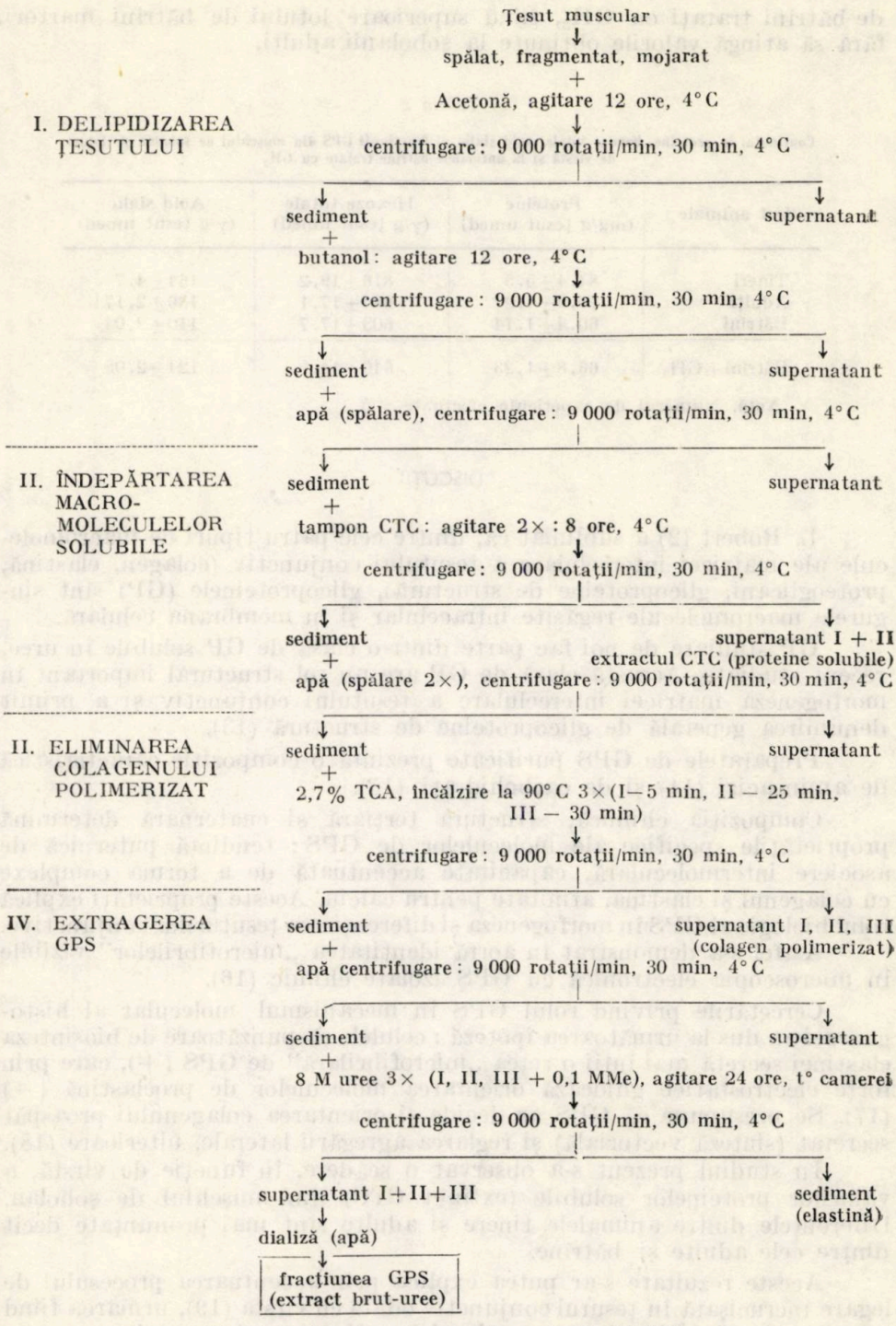


Fig. 1. — Procedeu de extracție a fracțiunii GPS.

de bătrîni trataţi cu GH_3, fiind superioare lotului de bătrîni martori, fără să atingă valorile obţinute la şobolanii adulţi.

Tabela 2

Conţinutul în proteine, hexoze totale, acid sialic al fracţiunii GPS din muşchiul de şobolan pe loturi de vîrstă şi la animalele bătrîne tratate cu GH_3

Lot animale	Proteine (mg/g ţesut umed)	Hexoze totale (γ/g ţesut umed)	Acid sialic (γ/g ţesut umed)
Tineri	84,4±5,5	816±19,2	164±4,7
Adulţi	70,9±1,2	684±17,1	136±2,17
Bătrîni	60,4±1,14	603±17,7	110±3,04
Bătrîni + GH_3	66,8±1,23	640±14,9	124±2,08

Notă. Numărul de experienţe efectuate = 5.

DISCUŢII

L. Robert (2) a subliniat că, dintre cele patru tipuri de macromolecule ale matricei intercelulare a ţesutului conjunctiv (colagen, elastină, proteoglicani, glicoproteine de structură), glicoproteinele (GP) sînt singurele macromolecule regăsite intracelular şi în membrana celulară.

GP studiate de noi fac parte dintr-o clasă de GP solubile în uree, recent studiate. Această clasă de GP are un rol structural important în morfogeneza matricei intercelulare a ţesutului conjunctiv şi a primit denumirea generală de glicoproteine de structură (13).

Preparatele de GPS purificate prezintă o compoziţie caracteristică de aminoacizi (14) şi de carbohidraţi (15).

Compoziţia chimică, structura terţiară şi cuaternară determină proprietăţile specifice ale moleculelor de GPS: tendinţă puternică de asociere intermoleculară, capacitate accentuată de a forma complexe cu colagenul şi elastina, afinitate pentru calciu. Aceste proprietăţi explică rolul biologic al GPS în morfogeneza şi diferenţierea ţesuturilor conjunctive. Astfel s-a demonstrat în aortă identitatea „microfibrilelor" vizibile în microscopia electronică cu GPS izolate chimic (16).

Cercetările privind rolul GPS în mecanismul molecular al histogenezei au dus la următoarea ipoteză: celulele răspunzătoare de biosinteza elastinei secretă mai întîi o reţea „microfibrilară" de GPS (+), care prin forţe electrostatice ghidează orientarea moleculelor de proelastină (—) (17). Se presupune că GPS ar decide şi orientarea colagenului proaspăt secretat (sinteză vectorială) şi reglarea agregării laterale, ulterioare (18).

În studiul prezent s-a observat o scădere, în funcţie de vîrstă, a valorilor proteinelor solubile (extract CTC) din muşchiul de şobolan. Diferenţele dintre animalele tinere şi adulte sînt mai pronunţate decît dintre cele adulte şi bătrîne.

Aceste rezultate s-ar putea explica prin accentuarea procesului de legare încrucişată în ţesutul conjunctiv odată cu vîrsta (19), urmarea fiind micşorarea solubilităţii macromoleculelor din ţesutul muscular.

Faptul că la animalele bătrîne tratate cu GH_3 valorile proteinelor solubile au fost mai mari decît la animalele de control ar indica o întîrziere a legării încrucișate în țesutul conjunctiv în urma tratamentului cu GH_3.

Referitor la scăderea, în funcție de vîrstă, a fracțiunii GPS din mușchiul de șobolan, exprimată prin conținutul în proteine, hexoze totale și acid sialic, aceasta s-ar putea atribui rolului litic al enzimelor lizozomale în cursul îmbătrînirii. Într-adevăr, o creștere dependentă de vîrstă a activității lizozomale reprezintă un factor important în procesele de degradare tisulară în senescență (20).

Compoziția țesutului elastic se modifică continuu cu vîrsta. Fibrele elastice formate din elastină și „microfibrile" de GPS (21) își modifică proporția relativă a acestor elemente structurale în ontogeneză. Conținutul în GPS al fibrelor, precum și viteza de sinteză a elastinei scad în îmbătrînire (22); în același timp are loc o creștere a activității elastazelor.

Fibrele elastice sînt fragmentate, degradate odată cu înaintarea în vîrstă, mai accelerat în unele boli degenerative (2), (17), (23).

S-a observat o creștere treptată a nivelului GP serice cu vîrsta, care a putut fi corelată cu procesele de distrugere tisulară posibil pe seama GPS din țesuturi. GP serice pot crește ca un rezultat al depolimerizării substanței fundamentale a țesutului conjunctiv, cu eliminarea componenților solubilizați în circulație (24), (25).

Lucrări recente pun în evidență tot mai mult rolul biologic important al componentului glucidic în structura GP. Acidul sialic, fiind la suprafața moleculei, influențează gradul hidrofiliei macromoleculelor de GPS, stabilitatea și viața moleculei (26). De asemenea protejează steric lanțurile proteice dispuse spre interiorul moleculei, mărind rezistența la proteoliză. Există posibilitatea ca moleculele de GPS să piardă acid sialic cu înaintarea în vîrstă, devenind astfel mai ușor lizate în țesuturi.

Există o asemănare de compoziție între GPS și GP din membrana celulară (27) și s-a emis ipoteza că GPS provin din GP de membrană (28). GP din membrană controlează strict fenomenele de adezivitate și de inhibiție a contactului intercelular, care coordonează creșterea armonioasă a celulelor. Aceste probleme sînt de o importanță decisivă pentru țesuturi în păstrarea troficității țesutului.

La animalele bătrîne tratate cu GH_3, GPS s-au menținut la un nivel mai ridicat decît la martori, ceea ce sugerează o întîrziere a procesului de distrugere tisulară.

CONCLUZII

Studiul modificărilor cu vîrsta ale glicoproteinelor de structură (GPS) din mușchiul coapsei membrelor posterioare de șobolan, precum și influența tratamentului cu GH_3 la animalele bătrîne au arătat următoarele:

1. Scăderea nivelului de GPS, hexoze totale și acid sialic cu vîrsta, precum și a conținutului de proteine solubile.

2. La lotul de animale bătrîne tratate, aceste valori sînt mai ridicate față de lotul de control, tinzînd către valorile găsite la animalele adulte.

3. Rezultatele noastre indică astfel scăderea GPS din mușchiul de șobolan în îmbătrînire și efectul pozitiv de întîrziere a acestei scăderi obținut prin tratament cu GH_3.

Aceste date se corelează cu cele obținute anterior referitor la acțiunea GH_3 (8) asupra țesutului conjunctiv.

Prezentat la redacție
la 6 martie 1980

Institutul național
de
gerontologie și geriatrie,
București

STRUCTURAL GLYCOPROTEINS FROM THE RAT MUSCLE IN SENESCENCE AND UNDER THE EFFECT OF GEROVITAL H_3 TREATMENT

SUMMARY

The content of total proteins, hexose and sialic acid was determined in the crude extract of structural glycoproteins from the thigh muscle of the hind limb of the young (2—3 months), adult (6—8 months), aged-control (22—24 months) and aged rats treated with Gerovital H_3; the soluble proteins of the muscle tissue were studied on the same groups of animals.

The levels of total proteins, hexose and sialic acid from the structural glycoprotein fraction decrease with age; in the same manner the content of soluble proteins from the muscle also decreases.

The values obtained for the aged rats treated with Gerovital H_3 were higher than those of the aged-control rats, close to the adult rats ones.

Thus, our results indicated the positive effect of Gerovital H_3, i.e. the retardation of ageing phenomena, on the aged muscular tissue.

BIBLIOGRAFIE

1. L. Robert, în *Medicinal chemistry*, V, *Aging of intercellular matrix. Molecular and cellular mechanism*, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1977, p. 319—330.
2. L. Robert, *Les glycoprotéines dans l'organisation de la matrice intercellulaire. Aspects ontogénétique, phylogénétiques et pathologiques*, Biol. Med., **4**, 1—30 (1975).
3. L. Robert, R. W. Darrell, B. Robert, în *NATO Symposium on the chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*, vol. 3: *Immunological properties of connective tissue glycoproteins*, sub red. G. R. Tristram, E. A. Balazs, 1970, p. 1991.
4. L. Robert, B. Robert, în *Connective tissues. Biochemistry and pathophysiology*, sub red. W. D. Wagner, T. B. Clarkson, Plenum Press, New York, 1974, p. 85—123.
5. L. Robert, B. Robert, *Immunology and aging*, Gerontologia, **19**, 330—350 (1973).
6. L. Robert, S. Derouette, E. Moczar, *Biochemical studies on the aging of rat tail tendon*, Gerontologie, **17**, 65—74 (1971).
7. J. Ouzilou, A. M. Robert, H. Bouissou, M. T. Pierragi, *Étude sur la composition de la paroi aortique normale et athérosclereuse*, Paroi artérielle, **1**, 105—116 (1973).
8. A. Aslan, S. Cîmpeanu, Al. Vrăbiescu, C. Domilescu, *Über die experimentelle Leberzirrhose der weissen Wistar-Ratten unter Einfluss der Behandlung mit Gerovital H_3*, Rev. Franç. Geront., **9**, 373 (1963); Intern. Conf. on Geront., Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1965, p. 833—844.

9. M. Moczar, L. Robert, *Extraction and fractionation of the media of the thoracic aorta: isolation and characterisation of structural glycoproteins*, Atherosclerosis, **11**, 7—25 (1970).
10. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *Protein measurement with the folin reagent*, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
11. R. S. Winzler, în *Methods in biochemical analysis: determination of serum glycoproteins*, vol. II, sub red. D. Glink, Intersci. Publ., New York, 1955, p. 279.
12. D. Aminoff, *Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids*, Biochem. J., **81**, 384—392 (1971).
13. A. M. Robert, B. Robert, L. Robert, în *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*, vol. 1 : *Chemical and physical properties of structural glycoproteins*, sub red. E. A. Balazs, Academic Press, New York, 1970, p. 237—242.
14. L. Robert, P. Comte, *Amino acid composition of structural glycoprotein*, Life Sci., **7**, 493—497 (1968).
15. E. Moczar, M. Moczar, L. Robert, *Isolation and characterisation of the glycopeptides of the structural glycoproteins of corneal stroma*, Life Sci., **8**, 757—762 (1969).
16. A. Kadar, B. Robert, L. Robert, *Étude biochimique et électromicroscopique des microfibrilles du tissu conjonctif*, Part. Biol., **21**, Suppl., 80—88 (1973).
17. L. Robert, B. Robert, A. M. Robert, *Molecular biology of elastin as related to aging and atherosclerosis*, Exp. Geront., **5**, 339—356 (1970).
18. L. Robert, B. Robert, *La biosinthèse des glycoproteines du tissu conjonctif et sa régulation*, Exp. Ann. Biochim. méd., **30**, 189—227 (1970).
19. F. Berzar, *The aging of collagen*, Sci. Amer., **208**, 104—117 (1963).
20. D. Platt, *Altersabhängige Aktivitätsänderungen Lysosomaler Enzyme (Glycosaminoglycano-Hydrolasen) in Serum und Organen des Menschen*, Dtsch med. Wschr., **95**, 634—637 (1970).
21. B. Robert, L. Robert, A. M. Robert, *Élastine, Élastase et Artériosclérose*, Path. Biol., **22**, 661—669 (1974).
22. L. Robert, W. Hornebeck, M. Moczar, *Biosynthesis and degradation of elastin as a function of age and atherosclerosis*, 11th International Congress of Gerontology, Tokyo, Japan, 1978.
23. Y. Moschetto, M. de Baker, O. Bizieux, H. Bouissou, M. T. Pierragi, M. Julian, *Evolution de l'élastine d'aorte humaines au cours du vieillissement*, Paroi artérielle, **2**, 161—178 (1974).
24. M. B. Engel, Arch. Path., **53**, 339 (1952).
25. G. L. Pinari, H. R. Catchpole, Arch. Path., **51**, 597 (1951).
26. R. K. Margolis, R. V. Margolis, Biochem. biophys. Acta, **324**, 154—190 (1973).
27. L. Robert, J. Fayolle, S. Derouette, J. Zabriskie, *Homology of amino acid composition of structural glycoproteins, transplantation antigens, cell wall glycoproteins and Streptococcus A cell membrane*, Transplant. Proc., **4**, 415—418 (1972).
28. L. Robert, B. Robert, în *Connective tissues. Biochemistry and pathophysiology: Structural glycoproteins of connective tissue. Their role in morphogenesis and immunopathology*, sub red. R. Fricke, F. Hartman, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1974, p. 240—256.

VARIAŢIA AMINOACIZILOR LIBERI DIN PLASMA SANGUINĂ ŞI FICAT ÎN DIABETUL ALOXANIC

V. DARIE, M. ŞERBAN

Rezumat. În diabetul aloxanic se constată modificări importante la nivelul aminoacizilor liberi din plasmă şi ficat, atît sub raport cantitativ cît şi calitativ. Se evidenţiază o creştere semnificativă de aminoacizi liberi la nivel plasmatic concomitent cu o scădere a lor la nivel hepatic. La nivelul ficatului se remarcă o scădere marcantă a concentraţiei aminoacizilor gluco- şi cetoformatori.

Diabetul aloxanic reprezintă un model adecvat de studiu al diabetului zaharat prin deficit de insulină (1), (2).

Pornind de la premisa că modificările la nivelul metabolismului proteic fac parte integrantă din tabloul sinoptic al modificărilor complexe care au loc în maladia diabetică şi ca o continuare a cercetărilor noastre anterioare (3), (4), (5), în această lucrare ne-am propus să urmărim variaţia aminoacizilor liberi din plasma şi din ficatul animalelor cărora li s-a indus diabet aloxanic.

Necesitatea investigării aminoacizilor liberi din ficat în diabetul aloxanic decurge din faptul că acest organ are un rol major în determinarea nivelelor de circulaţie şi, respectiv, în circuitul aminoacizilor, precum şi din faptul că ficatul este sediul ciclului urogenezei (6). Totodată, la nivelul ficatului, anumiţi aminoacizi se pot integra în circuitul gluconeogenezei.

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe şobolani masculi din rasa Sprague Dowley, în vîrstă de 6—8 luni şi cu o greutate cuprinsă între 225 şi 335 g. Experienţele s-au efectuat pe două loturi : un lot normal şi un lot la care a fost indus diabet aloxanic. Inducerea diabetului aloxanic s-a realizat prin injectarea intraperitoneală a unei doze de aloxan de 12,5 mg/100 g corp în soluţie tampon fosfat-citrat de pH 3,5. Determinarea glicemiei a relevat o manifestare trifazică ; s-a apreciat că şobolanii sînt în stare diabetică din momentul în care s-a instalat o fază de hiperglicemie permanentă cu valori cuprinse între 450 şi 650 mg glucoză/100 ml.

Animalele au fost sacrificate prin exsanguinare cardiacă, prelevîndu-se sîngele şi ficatul. Sîngele a fost recoltat pe heparină, iar din plasma obţinută prin centrifugare s-a dozat glucoza prin metoda cu ortotoluidină (7). Valorile glicemiei s-au exprimat în mg glucoză la 100 ml plasmă.

Ficatul prelevat a fost spălat în mod repetat în ser fiziologic, la rece, şi ulterior omogenizat într-un omogenizator tip Potter, utilizîndu-se ca extractant tampon TRIS-HCl de pH 7,4 ; raportul de extracţie a fost de 1 g ţesut la 3 ml soluţie tampon. Omogenatul a fost apoi centrifugat la 5000×g, la rece, timp de 30 de minute.

Pentru dozarea aminoacizilor liberi din plasmă, s-au introdus într-o eprubetă de centrifugă 8 ml acetonă clorhidrică şi 2 ml plasmă. Proba respectivă s-a centrifugat la 5000×g timp de 10 minute. Supernatantul obţinut s-a trecut într-o capsulă, iar precipitatul s-a reluat de mai multe ori cu acetonă clorhidrică. După centrifugare, supernatantul obţinut s-a adăugat celui iniţial, care s-a evaporat la temperatura camerei.

St. cerc. biochim., 23, 2, 135—140 (1980)

Pentru dozarea aminoacizilor liberi din ficat, din extractul de ficat s-a măsurat un volum de 20 ml, la care s-au adăugat 20 ml acid tricloracetic 10%. După agitare şi centrifugare timp de 20 de minute la 5000 × g, supernatantul s-a trecut printr-o coloană de Zerolit 225 (SRC 10) 4—5/DVB, 52—100 mesh, cu dimensiunea de 0,9 × 10 cm, aminoacizii liberi din soluţia triclor-acetică fiind reţinuţi pe coloana de schimbători de ioni. Debitul de curgere a fost de 2 ml/min. După introducerea probelor, s-au adăugat 50 ml apă distilată pentru îndepărtarea substanţelor nereţinute, iar eluţia aminoacizilor reţinuţi de răşină s-a efectuat cu 30 ml dintr-o soluţie de amoniac 5%.

Soluţia amoniacală, trecută cantitativ în capsule de sticlă, a fost evaporată la sec pe o baie de apă. Reziduul, perfect alb şi cu aspect cristalin, a fost reluat cu 3—5 ml apă distilată şi evaporat din nou pentru îndepărtarea urmelor de amoniac, operaţie care a fost repetată de trei ori. După eluţia aminoacizilor, coloanele de Zerolit au fost regenerate, trecîndu-se succesiv 25 ml apă distilată, 50 ml HCl 1 N şi apoi apă distilată pînă la reacţia neutră. Reziduurile din capsule au fost utilizate pentru dozarea aminoacizilor liberi (8).

Pentru separarea şi dozarea aminoacizilor individuali s-a utilizat aminoacidanalizorul model AAA 881, provenit de la firma Microtechna Praha. Rezultatele determinării colorimetrice a soluţiilor compuşilor coloraţi, rezultaţi din reacţia cu ninhidrină a aminoacizilor separaţi cromatografic, au fost înregistrate sub formă de diagrame. În funcţie de concentraţiile lor şi de intervalul de eluţie, aminoacizii s-au înregistrat individual sub forma unor piscuri. Valorile cantitative respective s-au obţinut prin integrarea suprafeţei piscurilor respective (9). Rezultatele au fost prelucrate statistic şi comparate prin testul Student.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate valorile concentraţiei aminoacizilor liberi din plasma şi ficatul de şobolani cu diabet aloxanic, comparativ cu lotul normal.

Tabela 1

Variaţia aminoacizilor liberi din plasma şi din ficatul de şobolani normali şi trataţi cu aloxan

	Aminoacizii liberi (mg%)		Testul r
	Plasmă	Ficat	
	X ± Sm	X ± Sm	
Lot normal	46 ± 5,80	140 ± 4,10	r = 0,8173 S
Lot aloxanizat	95 ± 8,30	89 ± 13,10	r = 0,7421 NS
Testul Student	t = 4,8412 S p < 0,01	t = 7,1393 S p < 0,001	
Creşterea (+) sau scăderea (−) faţă de normal	+206,50	−36,43	

Din datele prezentate rezultă că nivelul plasmatic al aminoacizilor liberi înregistrează o creştere semnificativă (+ 206,5%) la lotul aloxanizat faţă de lotul martor. În schimb, nivelul aminoacizilor liberi din ficat înregistrează o scădere semnificativă (— 36,43%) la lotul tratat cu aloxan în comparaţie cu lotul martor.

La lotul normal, concentraţia aminoacizilor liberi din plasmă se corelează cu concentraţia aminoacizilor liberi din ficat (testul r semnificativ), în timp ce la lotul aloxanizat aceeaşi corelaţie este nesemnificativă, deşi aproape de pragul de semnificaţie.

Aceste constatări evidenţiază faptul că, în condiţii normale, există o strînsă interdependenţă între nivelul plasmatic şi cel hepatic al aminoacizilor liberi, ceea ce denotă că sursa aminoacizilor liberi plasmatici este ficatul.

La lotul aloxanizat, această corelaţie nu se evidenţiază însă. Se poate presupune că în cazul diabetului aloxanic creşterea nivelului plasmatic al aminoacizilor nu se datoreşte decît în parte ficatului, această creştere avînd probabil ca sursă şi alte ţesuturi.

O altă observaţie constatată este aceea că în diabetul aloxanic, ca şi în diabetul zaharat uman (5), se înregistrează o creştere semnificativă a nivelului plasmatic al aminoacizilor liberi. Rezultă astfel că hiperaminoacidemia este una din caracteristicile generale ale tuturor formelor de diabet zaharat şi experimental, iar valoarea aminoacidemiei poate deveni un indice clinic important în caracterizarea şi în evaluarea diabetului zaharat (2). Această creştere semnificativă se poate interpreta fie ca o intensificare a procesului de proteoliză, fie ca o limitare a încorporării unor aminoacizi în macromoleculele proteice, respectiv inhibiţie a biosintezei proteice indusă de aloxan (5), (6).

Scăderea semnificativă a concentraţiei de aminoacizi liberi din ficat se poate explica prin faptul că în diabet se înregistrează o creştere a procesului de gluconeogeneză şi cetogeneză pe seama aminoacizilor gluco- şi cetoformatori, fapt confirmat şi de datele din literatură (10), (11).

Modificările menţionate referitoare la nivelul aminoacizilor liberi se corelează cu variaţia aminoacizilor liberi individuali din ficat la lotul cu diabet aloxanic, în comparaţie cu lotul normal.

În tabela 2 sînt prezentate valorile relative ale concentraţiei aminoacizilor determinaţi cromatografic pentru cele două loturi investigate. De asemenea, în figurile 1 şi 2 sînt prezentate comparativ cele două tipuri de cromatograme corespunzătoare loturilor respective.

Tabela 2

Variaţia aminoacizilor liberi din ficatul de şobolan normal şi cel cu diabet aloxanic *

Aa	Normal	Aloxan	Scădere (%)	Aa	Normal	Aloxan	Scădere (%)
Arg	154,30	7,70	95,0	Ala	775,80	450,20	42,0
Asp	70,30	52,40	25,4	Val	341,40	101,40	70,3
Tre	82,20	56,05	36,0	Met	127,70	31,21	75,5
Ser	418,10	42,05	90,0	Ileu	181,90	52,70	71,0
Glu	1065,50	170,70	84,0	Leu	57,80	52,10	10,0
Pro	84,40	32,01	62,0	Tyr	28,40	21,30	25,0
Gly	809,90	273,70	66,2	Phe	32,30	23,90	26,0

* Fiecare cifră reprezintă conţinutul în aminoacizi, exprimat în mM la 5 ml tampon (pH 2,2), în care se dizolvă reziduul obţinut din prelucrarea extractului de ficat.

Din analiza acestor date rezultă că întreaga gamă de aminoacizi liberi din ficat este diminuată semnificativ.

O scădere evidentă prezintă aminoacizii utilizaţi în procesul de gluconeogeneză, şi anume serina (90%), acidul glutamic (84%), glicocolul (66,2%), alanina (42%), treonina (36%).

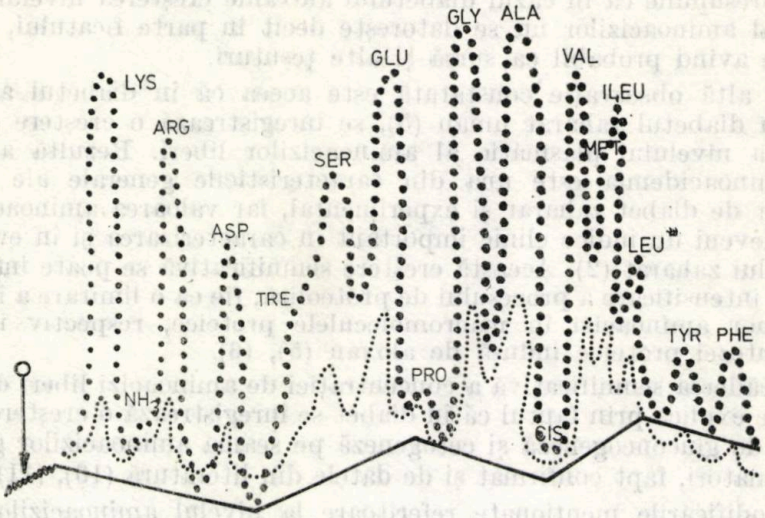


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor liberi din ficatul de şobolan normal (proba 13).

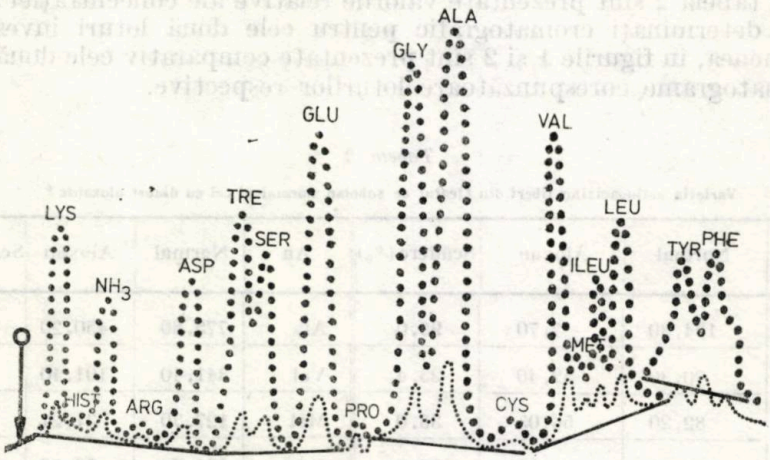


Fig. 2. — Cromatograma aminoacizilor liberi din ficatul de şobolan cu diabet aloxanic (proba 24).

Se remarcă totodată o scădere accentuată a concentraţiei aminoacizilor cu funcţie cetogenă: izoleucina (71%), valina (70,3%), fenilalanina (26%), tirozina (25%), leucina (10%). Izoleucina înregistrează o scădere mai accentuată decît ceilalţi aminoacizi, izoleucina fiind în acelaşi timp şi aminoacid glucoformator.

Este de relevat şi faptul că metionina hepatică scade semnificativ (76,5%) în stadiul diabetic comparativ cu stadiul normal, ceea ce presupune că sînt afectate şi procesele biochimice, în care metionina intervine în special ca agent de metilare (12).

Scăderea cea mai evidentă o înregistrează însă concentraţia de arginină (95%), fapt care poate avea repercusiuni asupra procesului ureogenezei (V. Darie, M. Şerban, date nepublicate, 1980) şi care denotă şi afectarea funcţiei hepatocitare, ştiind că ficatul este unicul sediu de sinteză al acestui aminoacid (10), (11).

Variaţia cantitativă a diferiţilor aminoacizi din ficat în diabetul aloxanic sugerează faptul că metabolismul intermediar al hepatocitului este viciat, fiind antrenat spre gluconeogeneză şi cetogeneză. Această ipoteză este susţinută şi de faptul că aminoacizii cu catene ramificate (valina, leucina, izoleucina), care în condiţii normale sînt metabolizaţi în ţesuturile extrahepatice (11), suferă în diabetul aloxanic modificări importante.

CONCLUZII

1. În diabetul aloxanic se înregistrează o hiperaminoacidemie, care este una dintre caracteristicile generale ale tuturor formelor de diabet.
2. Concentraţia aminoacizilor liberi din ficat este semnificativ scăzută în diabetul aloxanic, datorită intensificării proceselor de gluconeogeneză şi de cetogeneză la nivelul acestui organ.
3. În diabetul aloxanic se constată o scădere marcantă a concentraţiei aminoacizilor gluco- şi cetoformatori din ficat.
4. Scăderea accentuată a concentraţiei de arginină hepatică sugerează afectarea procesului de ureogeneză.

Prezentat la redacţie
la 20 mai 1980

Facultatea de medicină, Craiova,
Disciplina biochimie
şi
Facultatea de medicină veterinară, Bucureşti,
Disciplina biochimie

THE VARIATION OF THE TOTAL AMOUNT OF FREE AMINO ACIDS FROM THE BLOOD PLASMA AND LIVER IN THE EXPERIMENTAL DIABETES

SUMMARY

Important quantitative and qualitative modifications at the level of free amino acids from the plasma and liver can be determined in the alloxanic diabetes. A significant increase of the total amount of free amino acids can be found in the plasma, concomitantly with their decrease at the hepatic level.

A marked decrease of the gluco-and keto-formative amino acids is detected in the liver.

BIBLIOGRAFIE

1. WEBB J. LEYDEN, *Enzymes and metabolic inhibitors*, Academic Press, New York — London, 1966.
2. V. DARIE, teză de doctorat, Bucureşti, 1979.
3. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **22**, *1*, 11—15 (1979).
4. V. DARIE, M. ŞERBAN, St. cerc. biochim., **22**, *2*, 133—136 (1979).
5. V. DARIE, V. SFÂRLEAZĂ, Acta diabetologica romana, **2**, *5—6*, 426—432 (1976).
6. V. DARIE, C. NEDELCU, An. Univ. Craiova, S. Şt. med., **2**, 114—117 (1977).
7. R. RICHTERICH, *Clinical chemistry. Theory and practice*, Academic Press, New York — London, 1969.
8. S. MOORE, W. N. STEIN, J. biol. Chem., **211**, 907 (1954).
9. * * * *Bedienungsanleitung des automatischen Aminosauren-Analysators*, nr. 881.
10. E. N. BERGMAN, R. N. HEITMANN, Fed. Proc., **37**, 1228—1232 (1972).
11. P. FELIG, Annu. Rev. Biochem., **44**, 933—955 (1975).
12. K. OBERDISSE, *Diabetes mellitus*, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1975.

EFECTUL GLUTARALDEHIDEI ASUPRA PERMEABILITĂŢILOR OSMOTICE ŞI DIFUZIONALE ALE VEZICII URINARE DE BROASCĂ

MARIA-LUIZA FLONTA, D.-G. MĂRGINEANU

Rezumat. S-a studiat influenţa tratării cu glutaraldehidă (GA) asupra permeabilităţilor osmotice ale vezicii urinare de broască pentru apă şi ionii fiziologici mici (Na^+, K^+, Cl^-) şi pentru apă şi un neelectrolit (zaharoza), precum şi asupra permeabilităţii difuzionale pentru apă. Fluxurile osmotice şi difuzionale au fost determinate din citiri cvasicontinue printr-o metodă bazată pe gravimetria de imersie, avînd sensibilitatea de 10^{-5} kg·m^{-2}·s^{-1}. Efectul cel mai clar manifestat al GA este creşterea cu $\approx$ 40% a permeabilităţii difuzionale a apei. Permeabilitatea pentru zaharoză în condiţii de fluxuri osmotice scade sub influenţa GA (cu $\approx$ 17%), iar permeabilităţile pentru ionii mici nu apar influenţate în mod uniform.

Imaginea arhitecturii moleculare a membranelor biologice ca mozaicuri fluide de proteine globulare incluse într-o matrice bimoleculară lipidică, în cadrul căreia prezintă o considerabilă mobilitate (1), permite şi impune o definire mai riguroasă la nivel de interacţiuni moleculare a noţiunii macroscopice de „permeabilitate". Conceptul mult disputat al „porilor apoşi", consideraţi în sens strict drept canale pentru trecerea moleculelor hidrofile, este înlocuit prin acela de agregate lipoproteice hidrofile cu o structură supusă atît fluctuaţiilor termice intramoleculare, cît şi deplasărilor în cadrul matricei lipidice.

Acest cadru conceptual justifică utilizarea din ce în ce mai largă a agenţilor chimici care modifică selectiv anumiţi componenţi ai membranelor celulare, pentru ca din efectul lor asupra permeabilităţii membranelor să se deducă participarea specifică a componenţilor membranei modificaţi în respectivele fenomene de transport (2).

În această lucrare prezentăm un prim grup de rezultate privind efectul glutaraldehidei asupra permeabilităţilor osmotice pentru apă împreună cu ionii fiziologici mici (Na^+, K^+, Cl^-), pentru apă împreună cu o moleculă mare (zaharoza) şi asupra permeabilităţii difuzionale pentru apă ale vezicii urinare izolate de broască. Am ales glutaraldehida deoarece este compusul cu cea mai largă utilizare pentru imobilizarea chimică a proteinelor membranare şi al cărui mecanism de acţiune este în linii mari cunoscut (3). Vezica urinară de broască este o membrană compusă pluricelulară (epiteliu), ale cărei proprietăţi de permeabilitate exprimă compunerea în serie şi în paralel a fluxurilor prin membranele celulare şi prin spaţiile intercelulare. Ea este un model experimental foarte larg utilizat datorită atît faptului că în mod fiziologic *(in situ)* este expusă gradienţilor osmotici, cît şi relativei uşurinţe de a fi manevrată.

MATERIALE ȘI METODE

Măsurarea fluxurilor s-a făcut printr-o metodă de gravimetrie de imersie bazată pe citirea la fiecare minut a greutății aparente (greutatea reală minus greutatea volumului de lichid dezlocuit) a unei incinte mici ($V \approx 0{,}5$ cm^3), umplută cu o soluție concentrată (c_i) și separată de membrana cu suprafață S ($\approx 0{,}6$ cm^2) de o soluție externă mult mai diluată (c_e). Incinta, imersată într-un volum V_e (de cel puțin 100 de ori mai mare decît V_i) de soluție externă, este suspendată printr-un fir de Cu foarte subțire de brațul unei microbalanțe, cu care se pot citi variații de ordinul 10^{-5} g. Fluxurile osmotice de apă și solviți prin membrană modifică atît V_i, cît și c_i (și în măsură mult mai mică V_e și c_e), făcînd să varieze greutatea aparentă a incintei. Această variație este dependentă direct de permeabilitățile osmotice ale membranei pentru apă (P_w) și pentru solviții permeanți (P_s). Metoda împreună cu teoria ei este prezentată într-o altă lucrare (4), așa încît menționăm numai sensibilitatea pentru fluxuri : 10^{-5} kg·m^{-2}·s^{-1}, precum și faptul că permite citiri cvasicontinue, spre deosebire de metodele de analiză fizico-chimică, care sînt discontinue, inclusiv cele cu izotopi.

Procedee experimentale. Exemplare mari de *Rana pipiens* sînt spinalizate și disecate, astfel ca să se evidențieze vezica urinară, în care prin cloacă se introduce soluție fiziologică Ringer. Vezica este ligaturată, prelevată și plasată în soluție Ringer, unde este tăiată apoi în două. Fiecare din cele două bucăți este cîntărită rapid ; apoi, una din ele este montată pe incinta umplută cu soluția concentrată, cu fața mucoasă către interior, și se fac cu ea citirile timp de $\sim$ 60 min. Cealaltă este plasată în soluția de glutaraldehidă ; se repetă și cu ea citirile în aceleași condiții.

În interiorul incintei am pus soluții 1 M de NaCl și de KCl, iar în exterior soluție Ringer. Gradientul de concentrație este foarte mare, astfel încît este de presupus că predomină fenomenele de transport pasiv. Pentru a verifica acest lucru, în unele experiențe soluția internă a conținut și 3 mM ouabaină ca inhibitor specific al transportului activ. De asemenea, pentru a evidenția și comportamentul osmotic al membranelor fixate cu GA față de molecule mari, într-un grup de experiențe soluția internă a fost zaharoză 1 M, iar în exterior apă distilată.

Deoarece apa izotopică („grea") — oxidul de deuteriu ^2H_2O — are o densitate net diferită față de apa normală (1,106 față de 0,998 g·cm^{-3} la 20° C), este posibil ca prin gravimetria de imersie să fie măsurate fluxurile difuzionale de apă prin membrana epitelială. Recent, pe baza acestui principiu, a fost studiată cinetica înlocuirii apei cu apă grea în mușchi fixat cu GA (5).

Soluții și reactivi. Soluția Ringer utilizată a avut compoziția: NaCl-114 mM, $CaCl_2$-1 mM, KCl-2 mM, $NaHCO_3$-2,3 mM ; glutaraldehida (Serva) a fost utilizată în concentrație de 2,5% în tampon fosfat 0,1 M ; ouabaina (strofantina G) este un produs Calbiochem (Los Angeles), zaharoza un produs Chemapol (Cehoslovacia), iar oxidul de deuteriu, producție sovietică, a avut puritatea 99,5%.

Calculul permeabilităților. Expresia generală a variației în timp a masei aparente (m) a incintei imersate este (4) :

$$m(t) = m_0 + A[1 - \exp(-at)] + B[1 - \exp(-bt)],$$

unde A, B, a și b sînt combinații cunoscute (dar relativ complicate) ale parametrilor experimentali ai sistemului și ale diferenței de permeabilități ($P_w - P_s$). Datorită valorii mari a raportului V_e/V_i, este justificată chiar aproximația liniară : $c_i - c_e = \text{constant} = \Delta c$. În acest caz, panta curbei $m(t)$ este constantă : $dm/dt = kS\Delta c^2(P_w - P_s)$, permițînd calculul simplu al permeabilităților. În această relație, k este coeficientul de proporționalitate între densitatea și concentrația unui anumit tip de soluție. O relație analogă cu precedenta permite calculul permeabilității difuzionale pentru apă (P'_w) din panta variației în timp a masei aparente a incintei umplute cu ^2H_2O-Ringer, imersată în H_2O-Ringer : $P'_w = -(dm/dt)/k \cdot S \cdot x_i(1 + V_i/V_e)$, unde x_i este concentrația procentuală a oxidului de deuteriu din soluția internă.

REZULTATE

Datele experimentale primare se prezintă sub forma ansamblului de valori ale masei aparente a incintei la diferiți timpi t, valori care determină curba $m(t)$. În figura 1 sînt reprezentate aceste valori pentru o pereche de membrane din aceeași vezică, una proaspătă și cealaltă fixată cu glutaraldehidă, care separă o soluție de KCl 1 M de soluția Ringer. Figura 2 redă un ansamblu similar de date atunci cînd membranele separă

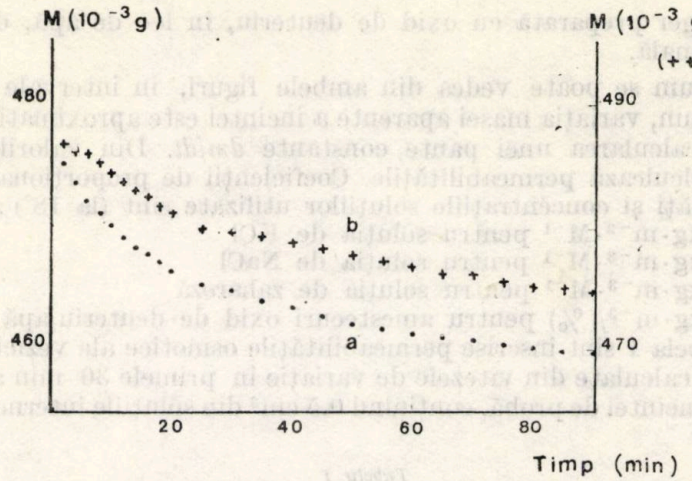


Fig. 1. — Variația în timp a masei aparente a incintei de probă, conținînd 0,532 cm³ KCl 1 M și separată printr-o suprafață de 0,710 cm² vezică urinară de broască de 70 cm³ soluție Ringer, în care este imersată :

a, vezica proaspătă ; *b*, vezica tratată cu GA.

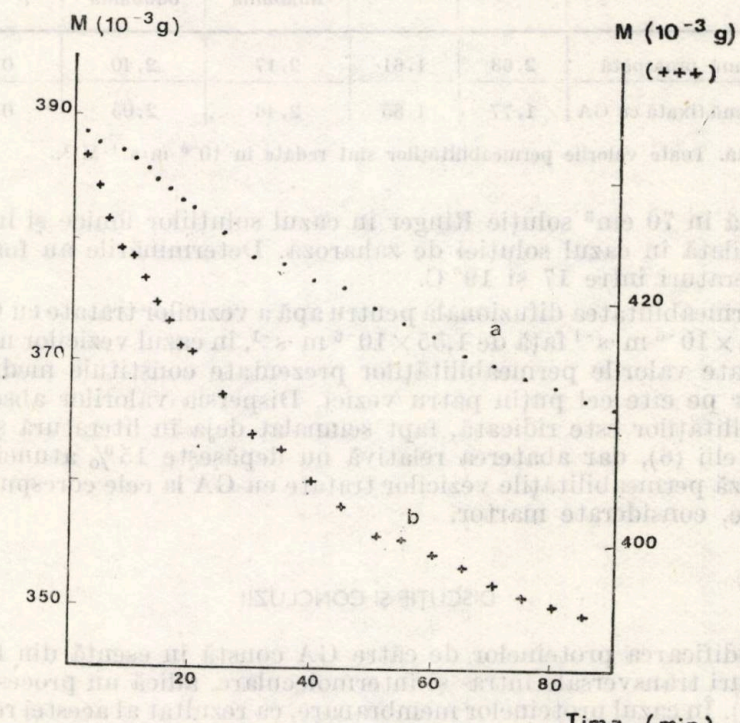


Fig. 2. — Variația în timp a masei aparente a incintei de probă, conținînd 0,503 cm³ ^2H_2O-Ringer și separată printr-o suprafață de 0,636 cm² vezică urinară de broască de 70 cm³ soluție Ringer :

a, vezica proaspătă ; *b*, vezica tratată cu GA.

soluţie Ringer preparată cu oxid de deuteriu, în loc de apă, de soluţie Ringer normală.

Aşa cum se poate vedea din ambele figuri, în intervale de timp pînă la 30 min, variaţia masei aparente a incintei este aproximativ liniară, permiţînd calcularea unei pante constante dm/dt. Din valorile acestei pante se calculează permeabilităţile. Coeficienţii de proporţionalitate (k) între densităţi şi concentraţiile soluţiilor utilizate sînt (la 18°):

40,5 $kg \cdot m^{-3} \cdot M^{-1}$ pentru soluţia de KCl
37,0 $kg \cdot m^{-3} \cdot M^{-1}$ pentru soluţia de NaCl
152 $kg \cdot m^{-3} \cdot M^{-1}$ pentru soluţia de zaharoză
1,175 $kg \cdot m^{-3}/(\%)$ pentru amestecuri oxid de deuteriu/apă

În tabela 1 sînt înscrise permeabilităţile osmotice ale vezicii urinare de broască, calculate din vitezele de variaţie în primele 30 min ale masei aparente a incintei de probă, conţinînd 0,5 cm^3 din soluţiile interne indicate

Tabela 1

Permeabilităţile osmotice pentru apă şi solviţi ale vezicii urinare de broască în stare proaspătă şi după tratare cu GA 2, %

Soluţia internă	KCl 1 M	NaCl 1 M	KCl 1 M + 3,3 mM ouabaină	NaCl 1 M + 3,3 mM ouabaină	Zaharoză 1 M
Membrană proaspătă	2,63	1,61	2,17	2,40	0,41
Membrană fixată cu GA	1,77	1,85	2,46	2,05	0,34

Notă. Toate valorile permeabilităţilor sînt redate în 10^{-6} $m \cdot s^{-1} \cdot M^{-1}$.

şi plasată în 70 cm^3 soluţie Ringer în cazul soluţiilor ionice şi în 70 cm^3 apă distilată în cazul soluţiei de zaharoză. Determinările au fost făcute la temperaturi între 17 şi 19° C.

Permeabilitatea difuzională pentru apă a vezicilor tratate cu GA 2,5% este $2{,}19 \times 10^{-6}$ $m \cdot s^{-1}$ faţă de $1{,}55 \times 10^{-6}$ $m \cdot s^{-1}$, în cazul vezicilor netratate.

Toate valorile permeabilităţilor prezentate constituie media determinărilor pe cîte cel puţin patru vezici. Dispersia valorilor absolute ale permeabilităţilor este ridicată, fapt semnalat deja în literatură şi pentru alte epitelii (6), dar abaterea relativă nu depăşeşte 15% atunci cînd se raportează permeabilităţile vezicilor tratate cu GA la cele corespunzătoare netratate, considerate martor.

DISCUŢIE ŞI CONCLUZII

Modificarea proteinelor de către GA constă în esenţă din formarea de legături transversale intra- şi intermoleculare, adică un proces de reticulare (7). În cazul proteinelor membranare, ca rezultat al acestei reticulări, este probabilă o stabilizare a zonelor hidrofile (proteice) din membrană, zone cu care se asociază permeabilitatea pentru apă şi electroliţi.

O primă observaţie generală care se impune din analiza rezultatelor este că GA nu produce — cel puţin în limitele metodei noastre de eviden-

țiere — modificări dramatice ale permeabilității pasive și, în orice caz, modificările induse nu decurg în același sens pentru toate tipurile de permeație urmărită. Creșterea cu $\approx 40\%$ a permeabilității difuzionale a apei în vezicile tratate cu GA poate fi atribuită rigidizării zonelor hidrofile, care nu mai fluctuează și deci sînt mai ușor traversate. Reticularea proteinelor, atît membranare, cît și din spațiile extracelulare ale vezicii, explică de asemenea scăderea permeabilității pentru o moleculă neelectrolitică relativ mare, așa cum este zaharoza.

În ceea ce privește permeabilitățile osmotice pentru apă și ionii fiziologici mici, trebuie notate mai întîi efectele contrare ale ouabainei asupra permeabilității K^+ și Na^+, probabil datorită sensurilor opuse de desfășurare a fluxurilor active ale acestor ioni. Faptul că și fixarea cu GA acționează în modalități contrare ar putea fi eventual atribuit efectelor diferite asupra fluxurilor de apă și asupra celor de solviți, dar considerăm că explicații prea speculative doar pe baza acestor rezultate sînt nejustificate. Ulterioare clarificări ar putea proveni fie din utilizarea altor tehnici de urmărire a permeabilității, fie din determinarea cu aceeași tehnică și a parametrilor termodinamici de activare a permeabilităților.

Prezentat la redacție
la 21 februarie 1980

Facultatea de biologie,
Laboratorul de biofizică
București, Splaiul Independenței nr. 91—95

GLUTARALDEHYDE EFFECT ON THE OSMOTIC AND DIFFUSIONAL PERMEABILITIES OF THE FROG URINARY BLADDER

SUMMARY

The effects of glutaraldehyde (GA) treatment on the osmotic permeabilities of frog urinary bladder a) for water with the small physiological ions Na^+, K^+, Cl^-; b) for water with a nonelectrolyte (sucrose) as well as on the water diffusional permeability were studied. Both osmotic and diffusional flows were determined from quasi-continuous readings by an immersion weighing method with 10^{-5} kg $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ sensitivity. The most obvious effect of GA is the increase (by about 40%) of the diffusional permeability of water. Sucrose permeability in osmotic flow conditions is diminished by about 17% while the permeabilities for small ions do not appear to be changed in a uniform manner.

BIBLIOGRAFIE

1. S. J. Singer, Annu. Rev. Biochem., **43**, 805 (1974).
2. S. Przestalski, *Biophysics of membrane transport*, Part II, Agricultural University of Wroclaw, 1979, p. 253—273.
3. A. D. Russell, D. Hopewood, Progr. Med. Chem., **13**, 271 (1976).
4. D.-G. Mărgineanu, M. L. Flonta, J. Biochem. Biophys. Methods, **3**, 129 (1980).
5. E. Katona, D.-G. Mărgineanu, V. Vasilescu, Cell Tissue Res., **203**, 331 (1979).
6. G. Monticelli, F. Celentano, G. Torelli, Biochim. biophys. Acta, **401**, 41 (1975).
7. G. C. Papageorgiou, *Photosynthesis in relation to model systems*, sub red. J. Barber, Elsevier/North Holland, 1979, p. 211—241.

COMPORTAREA LA DIFERITE pH-URI A PROTEAZELOR OBŢINUTE LA SEPARAREA PRIN GELFILTRARE A EXTRACTULUI LIZOZOMAL DIN FICATUL DE ŞOBOLAN

ELENA GANEA, SABINA GHEORGHE, S. A. HULEA

Rezumat. Activitatea proteolitică a primelor două piscuri, L_{120} şi L_{60} (în cel de-al treilea, L_{20}, Kirschke şi colab. au descris catepsina L), obţinute prin gelfiltrarea pe Sephadex G—75 a extractului lizozomal din ficatul de şobolan asupra IgG umane şi BSA în prezenţa şi în absenţa cisteinei şi EDTA 2 mM, a fost urmărită la pH 3—7. Enzimele fracţiunii L_{120} prezintă pe tot intervalul de pH o activitate proteolitică mai mare pentru BSA decît pentru IgG umană, în timp ce la L_{60} situaţia este inversă. Pentru ambele substrate, activitatea L_{120} creşte de la pH acid spre pH neutru ; de asemenea, pentru fracţiunea L_{60}, avînd ca substrat BSA ; L_{60} prezintă activitatea optimă la pH 5 pentru proteoliza IgG. Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă şi imunoelectroforeza au arătat un mod diferit de hidroliză a celor două substrate la pH acid faţă de cel neutru. Modificările întîlnite sugerează prezenţa unor proteaze acide şi a unor tiolproteaze neutre în fracţiunea L_{120}, precum şi a unor tiolproteaze acide şi neutre în fracţiunea L_{60}.

Cunoaşterea enzimelor proteolitice din celulă este absolut necesară înţelegerii mecanismelor de degradare intracelulară a proteinelor. S-a descris pînă în prezent un mare număr de proteaze lizozomale (catepsinele A, B_1, B_2, C, D, E, F, F_G, G, G_F, H, S), cele mai multe avînd acţiune exopeptidazică. O degradare intensă şi rapidă a proteinelor nu poate avea loc însă decît în prezenţa endopeptidazelor. Dintre acestea, în lizozomii din ficatul de şobolan au fost cunoscute pînă nu demult numai catepsinele B_1 şi D. Folosind inhibitori specifici acestor endopeptidaze, ulterior s-a demonstrat existenţa unei activităţi endopeptidazice tiol-dependente, datorată unei noi enzime (1), (2). După studii începute cu aproape zece ani în urmă (3), (4), (5), recent a fost izolată şi caracterizată catepsina L, cea mai activă endopeptidază la pH 6—7, din lizozomii din ficatul de şobolan (6). Enzima a fost separată prin cromatografia pe CM Sephadex a celui de-al treilea pisc, obţinut la gelfiltrarea pe Sephadex G—75 a extractului lizozomal.

În lucrarea de faţă am urmărit prezenţa altor endopeptidaze, determinînd activitatea proteolitică a primului şi a celui de-al doilea pisc, obţinute la gelfiltrarea pe Sephadex G—75 asupra albuminei serice bovine şi IgG umane, la diferite pH-uri, în prezenţa sau în absenţa unor efectori.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea extractului lizozomal. Separarea şi purificarea fracţiunii lizozomale din ficatul de şobolan s-au utilizat după metoda Trouet (7), modificată de Kussendrager şi colab. (8). Gradul de purificare a fracţiunii lizozomale, comparativ cu omogenatul, s-a estimat prin determinarea activităţii specifice a fosfatazei acide (9).

Gelfiltrarea pe Sephadex G-75. Extractul lizozomal s-a aplicat pe o coloană de Sephadex G-75. Eluţia s-a realizat cu tampon fosfat 0,01 M, pH 6,9 conţinînd KCl 0,15 M (3). Cele trei piscuri obţinute, denumite de Bohley şi colab. (3) fracţiunea L_{120}, L_{60} şi, respectiv, L_{20} după greutăţile moleculare ale proteinelor corespunzătoare, au fost concentrate prin ultrafiltrare.

Determinarea activităţii proteolitice a fracţiunilor L_{120} şi L_{60}. Substratele folosite au fost albumina serică bovină îmbogăţită în fracţiunea V (Fluka AG) şi IgG umană preparată prin precipitare cu sulfat de amoniu 40% şi cromatografie pe DEAE-celuloză (10). Incubarea s-a făcut în tampon McIlvain 0,1 M pH 3, tampon acetat 0,1 M pH 4 şi 5 şi tampon fosfat 0,1 M pH 6 şi 7, la 37° C, 24 de ore. Raportul proteină enzimatică/proteină substrat a fost 1/10. În paralel s-a urmărit şi influenţa cisteinei şi EDTA în concentraţie de 2 mM.

Alicote din amestecul de incubare au fost precipitate cu TCA 5%, în supernatant determinîndu-se cantitatea de material peptidic eliberat prin metoda Lowry (11).

Analiza produşilor de hidroliză. Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a efectuat după Davis (12). Imunoelectroforeza s-a realizat în gel de agaroză 1% cu tampon veronal pH 8,6, folosindu-se serul imun anti-IgG uman livrat de Institutul „Dr. I. Cantacuzino".

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Acţiunea proteolitică a fracţiunii L_{120} asupra BSA

Degradarea BSA de către proteazele prezente în fracţiunea L_{120} a fost urmărită prin : a) determinarea peptidelor TCA solubile eliberate în urma hidrolizei la diferite valori de pH, exprimate ca procente din cantitatea de material proteic iniţială ; b) disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a amestecului de incubare înainte şi după hidroliză.

Activitatea proteolitică maximă se înregistrează la pH 5, scăzînd atît spre domeniul mai acid, cît şi spre cel neutru. Prezenţa cisteinei şi a EDTA indică o creştere a activităţii proteolitice pe tot intervalul de pH studiat, mai accentuată la pH neutru (fig. 1), ceea ce sugerează existenţa unor tiolproteaze în această fracţiune.

Într-o lucrare anterioară, urmărind acţiunea inhibitorilor asupra activităţii proteolitice a enzimelor din fracţiunea L_{120} la pH 6, Salama şi Bohley (13), folosind azocazeina ca substrat, au sugerat natura serinprotează a majorităţii enzimelor din această fracţiune. Referindu-se la un interval de pH mai larg şi folosind BSA ca substrat, experienţele de faţă arată în plus existenţa unor tiolproteaze active mai ales spre domeniul de pH neutru.

Date suplimentare privind modul de acţiune al acestor proteaze s-au obţinut prin experienţele de disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă. Probele martor (BSA incubată în aceleaşi condiţii de temperatură, pH şi activatori în absenţa enzimelor) nu prezintă diferenţe în aspectul lor electroforetic şi sînt redate în figura 2, *a*. Proteazele fracţiunii L_{120} produc modificări importante, în special la pH 3 şi 4, concretizate prin apariţia a două (fig. 2, *b*) şi, respectiv, a unei benzi proteice suplimentare (fig. 2, *c*), cu viteze de migrare mai mari decît ale fracţiunii V albuminice. Aceste fragmente, corespunzătoare unor peptide de greutăţi moleculare mai mici, provin din degradarea fracţiunilor albuminice I—V şi sînt probabil precipitabile cu TCA. Prezenţa lor nu poate fi deci detectată în supernatant, ceea ce explică valorile mici ale peptidelor TCA solubile eliberate în urma hidrolizei la pH 3 şi 4.

Aceeaşi corelaţie inversă între cele două tipuri de experimente se întîlneşte şi la pH 6 în prezenţa activatorilor. Maximul de activitate

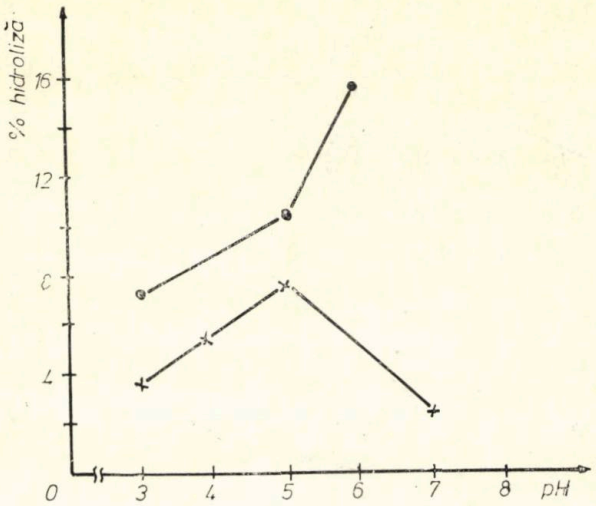


Fig. 1. — Peptide TCA solubile (%) eliberate la hidroliza BSA de către fracțiunea L_{120} în prezența (—●—●) și în absența (—×—×) cisteinei și EDTA.

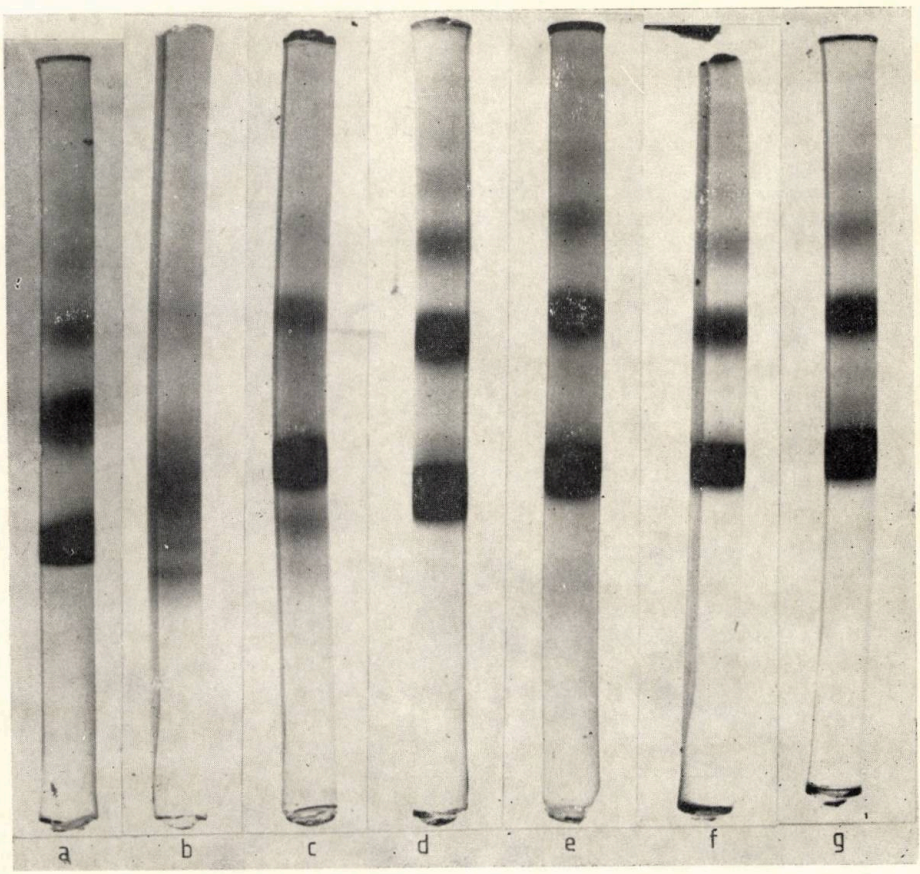


Fig. 2. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a BSA incubate 24 de ore la 37° C : *a*, martor; în prezența fracțiunii L_{120} la : *b*, pH 3; *c*, pH 4; *d*, pH 5; *e*, pH 5 + cisteină 2 mM și EDTA 2 mM; *f*, pH 6 + cisteină 2 mM și EDTA 2 mM; *g*, pH 7.

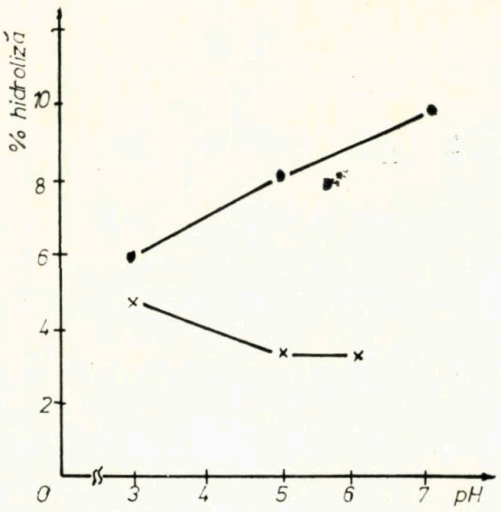


Fig. 3. — Peptide TCA solubile (%) eliberate la hidroliza IgG de către fracţiunea L_{120} în prezenţa (— ● — ●) şi în absenţa (— × — ×) cisteinei şi EDTA.

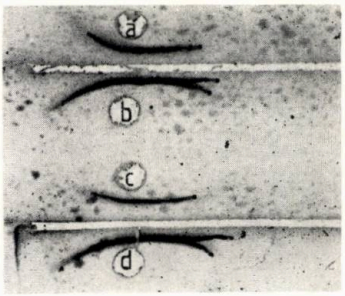


Fig. 4. — Imunoelectroforeza IgG umane incubate în prezenţa fracţiunii L_{120} şi a activatorilor la : *b*, pH 5 şi *d*, pH 7; *a* şi *c* reprezintă probele martor respective.

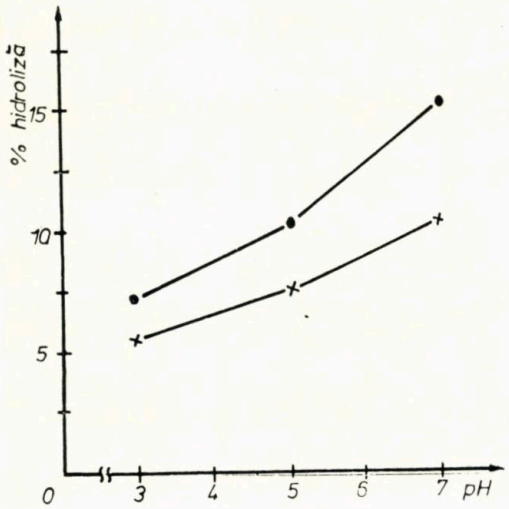


Fig. 5. — Proteoliza BSA (— ● — ●) şi a IgG umane (— × — ×) de către L_{120} în prezenţa cisteinei şi EDTA.

proteolitică existentă la acest pH, exprimată prin valoarea peptidelor TCA solubile, este evidențiat pe gelul de PAA numai prin diminuarea tuturor fracțiunilor albuminice. Noi fragmente și, respectiv, noi benzi proteice nu apar; produșii de scindare, avînd greutăți moleculare mici, ies din gel în timpul migrării electroforetice.

Așadar, BSA este degradată de către proteazele prezente în fracțiunea lizozomală L_{120} în mod diferit în funcție de pH: la pH-uri acide apar fragmente mari, precipitabile cu TCA; la pH 6—7 se produc peptide mici, TCA solubile.

Aceasta se poate datora fie pH-ului optim diferit al proteazelor existente în L_{120}, fie modificării conformației substratului în funcție de pH în sensul creșterii accesibilității enzimelor.

Acțiunea proteolitică a fracțiunii L_{120} asupra IgG umane

Fracțiunea L_{120} are o activitate proteolitică relativ scăzută asupra IgG, în absența activatorilor (fig. 3). Prezența cisteinei și EDTA stimulează activitatea proteolitică pe tot intervalul de pH studiat, dar mai ales în apropierea pH-ului neutru, fapt întîlnit și la BSA (fig. 1).

Imunoelectroforeza produșilor de reacție prezintă rezultate concordante, și anume la valorile mici de hidroliză, corespunzătoare pH-urilor 3 și 4, nu se obțin modificări imunoelectroforetice importante. La pH 5 și 7 se observă apariția, în urma hidrolizei, a unor produși de tipul F_{ab} și F_c (fig. 4).

Aceste rezultate sugerează deci, ca și în cazul precedent (substrat BSA), prezența în L_{120} a unor proteaze acide, activate moderat de cisteină și EDTA, precum și a unor tiolproteaze neutre. IgG umană este degradată de aceste enzime în fragmente de tip F_{ab} și F_c și peptide mici TCA solubile, care nu mai dau reacție de precipitare cu serul imun anti-IgG.

La eliberarea fragmentelor TCA solubile este posibil să fi contribuit și acțiunea unor exopeptidaze prezente în preparat, așa cum de altfel au arătat și Bohley și colab. (3) lucrînd pe fracțiunea proteică solubilă din citosol (CP_1) ca substrat.

Comparînd hidroliza de către L_{120} a celor două substanțe studiate în prezența activatorilor, observăm că prezența pH-ului se manifestă similar la BSA și IgG umană, activitatea proteolitică crescînd de la pH acid spre pH neutru; ea este mai mare în cazul BSA decît în cel al IgG pe tot intervalul (fig. 5). Susceptibilitatea mai mică a IgG la proteoliză se explică, desigur, prin specificitatea enzimelor față de substrat, așa cum și Ansorge și colab. au găsit că la pH neutru toate fracțiunile lizozomale au activitate mai mare pentru CP_1 decît pentru hemoglobină (14); o altă cauză poate fi însă și faptul că, pentru scindarea completă a IgG de către catepsinele lizozomale, este necesară deplierea prealabilă a structurii compacte a fragmentului F_{ab} de către unele disulfid-reductaze, așa cum au demonstrat Gheție și Motaș (15). Lucrări anterioare au arătat că fracțiunea L_{120}, reprezentînd 60% din proteinele fracțiunii lizozomale totale și numai 10—12% din activitatea proteolitică totală asupra cazeinei și proteinelor din citosol la pH 6—7 (4), este compusă în majoritate din serin-proteaze (13). Experiențele efectuate la diferite valori de pH, avînd ca substrat BSA și IgG, au demonstrat existența în plus a unor proteaze acide și tiolproteaze neutre.

Acţiunea proteolitică a fracţiunii L_{60} asupra BSA şi IgG umane

Determinarea activităţii proteolitice a fracţiunii L_{60} asupra proteinelor din citosol la pH 6—7 a demonstrat că ea reprezintă numai 10% din activitatea proteolitică a fracţiunii lizozomale totale (3), (4).

Studiile făcute cu efectori asupra enzimelor din L_{60} la pH 6—7, folosind azocazeina ca substrat (12), au arătat că această fracţiune lizozomală este constituită în special din carboxiproteaze, existenţa unor tiolproteaze fiind de asemenea posibilă.

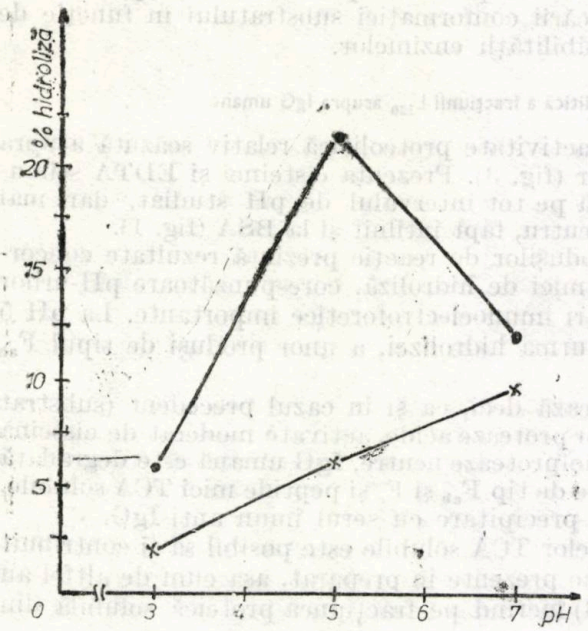


Fig. 6. — Peptide TCA solubile (%) eliberate la hidroliza BSA (—●—●) şi IgG umane (—×—×) de către L_{60} în prezenţa cisteinei şi EDTA.

În lucrarea de faţă, urmărind proteoliza BSA şi IgG umane de către enzimele fracţiunii L_{60} la pH 3—7, s-au obţinut rezultatele ilustrate în figura 6.

Susceptibilitatea celor două substrate faţă de enzimele fracţiunii L_{60} este diferită de cea faţă de enzimele din L_{120} (fig. 1), IgG fiind un substrat mai bun decît BSA pentru L_{60} şi invers pentru L_{120}.

Degradarea BSA creşte de la pH acid spre pH neutru, unde atinge maximul (fig. 6). Această activitate maximă se datoreşte probabil tiolproteazelor neutre, semnalate şi de Salama şi Bohley (13). La pH 3, deşi eliberarea peptidelor TCA solubile indică o hidroliză scăzută, separarea produşilor de incubare prin disc-electroforeză în gel de poliacrilamidă (fig. 7) arată producerea unor fragmente proteice cu viteză de migrare mai mare decît a fracţiunii V albuminice, precipitabile probabil cu TCA. Formarea acestor fragmente poate fi rezultatul acţiunii carboxiproteazelor active la pH acid.

În cazul IgG, interesant este faptul că maximul de hidroliză are loc în prezenţa cisteinei şi EDTA la pH 5, ceea ce nu poate fi datorat

decît unei tiolproteaze active la acest pH, nesemnalată în lucrările anterioare. IgG a fost supusă hidrolizei catepsinei B_1 (16), catepsinelor D și E (17), ca și unor proteaze neutre (18), fragmentele obținute fiind izolate cu ajutorul antiserurilor specifice.

Imunoelectroforeza, efectuată în această lucrare cu anti-IgG, nu a condus la rezultate concludente, ceea ce indică necesitatea folosirii serurilor imune antifragmente în vederea caracterizării acțiunii proteazelor din L_{60} asupra IgG.

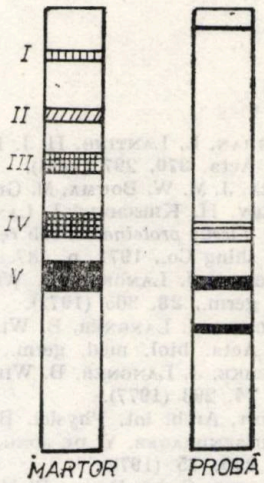


Fig. 7. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a BSA incubate cu fracțiunea L_{60} la pH 3.

Lucrarea de față este o dovadă în plus a eterogenității enzimelor lizozomale, a căror cunoaștere ne va permite în viitor înțelegerea complicatelor mecanisme de degradare intracelulară a proteinelor.

Prezentat la redacție
la 2 iunie 1980

Institutul de științe biologice, București

THE pH INFLUENCE ON THE PROTEOLYTIC ENZYMES OBTAINED BY GEL FILTRATION OF RAT LIVER LYSOSOMAL EXTRACT

SUMMARY

The proteolytic activity of the L_{120} and L_{60} fractions, obtained by Sephadex G 75 gel filtration of rat liver lysosomal extract (cathepsin L from the L_{20} fraction was purified by Kirscke et al.), has been investigated using BSA and human IgG as substrates, in the presence and absence of cysteine and EDTA in the pH range 3—7. The proteolytic activity of the L_{120} enzymes was higher as against BSA than IgG over the whole pH range, whereas that of L_{60} fraction was higher as against IgG. For both substrates the enzyme activity in the L_{120} fraction increased from the acidic to neutral pH.

The same pattern was found for the L_{60} fraction when BSA was the substrate, but with IgG as substrate the highest proteolytic activity was recorded at pH 5.

There was a different pattern of substrate breakdown at acidic and neutral pH by the L_{120} and L_{60} enzymes as shown by polyacrylamide gel disc electrophoresis and immunoelectrophoresis.

The results suggest the presence in the L_{120} fraction of acid proteinases and of some neutral thiol-proteinases in the L_{60} fraction in the presence of acid and neutral thiol-proteinases.

BIBLIOGRAFIE

1. W. Huisman, L. Lanting, H. J. Doddema, J. M. Bouma, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **370**, 297 (1974).
2. E. Ganea, J. M. W. Bouma, M. Gruber, Rev. roum. Biochim., **14**, *1*, 13–17 (1977).
3. P. Bohley, H. Kirschke, J. Langner, S. Ansorge, B. Wiederanders, H. Hanson, în *Tissue proteinases*, sub red. A. J. Barett şi J. T. Dingle, North-Holland Publishing Co., 1971, p. 187.
4. H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, Acta biol. med. germ., **28**, 305 (1972).
5. H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, U. Broghammer, Acta. biol. med. germ., **35**, 285 (1976).
6. H. Kirschke, J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, Eur. J. Biochem., **74**, 293 (1977).
7. A. Trouet, Arch. int. Physiol. Biochim., **245**, 4001 (1970).
8. K. O. Kussendrager, Y. de Jong, J. M. W. Bouma, M. Gruber, Biochim. biophys. Acta, **279**, 75 (1972).
9. R. Gianetto, C. de Duve, Biochem. J., **59**, 433 (1955).
10. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
11. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
12. B. J. Davis, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 401 (1964).
13. Z. B. Salama, P. Bohley, Acta biol. med. germ., **36**, 1939 (1977).
14. S. Ansorge, P. Bohley, H. Kirschke, J. Langner, H. Hanson, Acta biol. med. germ., **26**, 953 (1971).
15. V. Gheţie, Cecilia Motaş, Immunochemistry, **3**, 251 (1966).
16. H. Menninger, K. Fehr, A. Böni, K. Otto, Immunochemistry, **13**, 633 (1976).
17. V. Gheţie, Silvia Mihăescu, Immunochemistry, **10**, 251 (1973).
18. J. Lo Spalluto, K. Fehr, M. Ziff, J. Immunol., **105**, 886 (1970).

FRACŢIONAREA IZOELECTRICĂ A COLAGENULUI ACIDO-SOLUBIL

SILVIA INDREI, V. GHEORGHE, GABRIELA ANGEL

Rezumat. Colagenul acido-solubil extras din tendon de coadă de şobolan a fost supus fracţionării izoelectrice. Gradientul de pH a cuprins domeniul 2,5—11; pe acest domeniu s-au separat şase fracţiuni, dintre care patru majore, cu pI-urile la 4,75, 6,25, 7,25, 9,80, şi două minore, cu pI-urile la 3,75 şi 7,80. S-au înregistrat spectrele de emisie fluorescentă şi de excitaţie ale fragmentelor separate prin fracţionare izoelectrică. Spectrele de emisie au fost dependente de lungimea de undă de excitaţie. În baza lungimilor de undă de excitaţie şi de emisie, se disting trei fracţiuni, situate în următoarele domenii de pH: 1) 2,9—3,6; 2) 3,7; 3) 3,8—7,0. Existenţa acestor fracţiuni poate fi interpretată în sensul apariţiei unor fluorofori adiţionali, în afară de tirozină, care duc la deplasări în spectrul de emisie.

Colagenul, cea mai importantă proteină structurală din organismele animale, este utilizat, datorită proprietăţilor sale specifice (schimbător de ioni; semipermeabilitate sub formă de membrană; antigenitate specială; factor de regenerare în leziuni ale pielii, vaselor etc.), în medicină şi biologie. În vederea acestor aplicaţii s-au întreprins numeroase studii utilizînd colagen solubilizat.

În principal există trei categorii de metode de solubilizare a colagenului: 1) extracţie la rece, 2) hidroliză şi 3) hidroliză enzimatică. Prin extracţie neutră la rece se obţin fragmente polipeptidice recent înglobate în structură; extracţia acidă la rece duce la fragmente mai vechi pe scară ontogenetică, cu o anumită proporţie de reticulări.

Proprietăţile de agregare ale colagenului acido-solubil (CAS), contribuţia diferitelor fragmente de colagen la formarea de agregate, mecanismul formării acestora sînt probleme încă deschise, intens studiate în prezent (1). S-a demonstrat că polimerizarea, respectiv reagregarea colagenului solubilizat, este un proces dirijat electrostatic. Cunoaşterea heterogenităţii moleculare, respectiv a speciilor moleculare conţinute în CAS, precum şi a distribuţiei de sarcini electrice, respectiv a punctelor izoelectrice ale acestora, este necesară în studiul colagenului acido-solubil.

Compoziţia CAS este sensibilă la o serie de factori biologici, cum ar fi starea fiziologică, starea de nutriţie şi vîrsta animalului (2). Cu vîrsta, compoziţia moleculară a CAS se modifică în sensul unei reticulări mai pronunţate, ceea ce duce la scăderea cantităţii totale de CAS extractabil (3). Asemenea studii ar progresa sensibil dacă ar exista o informaţie mai consistentă referitoare la heterogenitatea moleculară a CAS.

Prezenta lucrare conţine rezultatele obţinute în direcţia separării componentelor CAS prin fracţionare izoelectrică. Caracterizarea fracţi-

St. cerc. biochim., 23, 2, 153—159 (1980)

unilor obţinute s-a făcut prin pH-metrie, spectrofotometrie şi spectrofotofluorimetrie.

Fracţionarea izoelectrică este o metodă adecvată pentru separarea şi studiul proteinelor similare, chiar în cazul în care diferenţele de structură sînt foarte mici, de exemplu de cîţiva aminoacizi (4). Concentrarea colagenului solubilizat într-un gradient de pH este posibilă datorită proprietăţilor amfoterice ale acestora.

Spectrofotofluorimetria s-a efectuat cu intenţia de a stabili caracteristici fluorescente specifice componentelor separate prin fracţionare izoelectrică, caracteristici care să poată servi la identificarea acestora.

MATERIALE ŞI METODE

Colagenul acido-solubil a fost extras din tendon de coadă de şobolan, după metoda P. E. McClain (5).

Fracţionarea izoelectrică s-a efectuat cu o instalaţie LKB 8100—1, coloana de 110 ml, cu sursa de putere LKB 3371—E. Gradientul de pH realizat cu amfoliţi tip LKB acoperea domeniul 2,5—11. Coloana a fost stabilizată contra curenţilor de convecţie printr-un gradient de sucroză. Separările au durat 60—66 de ore, menţinîndu-se puterea pe coloană în jur de 3 W. S-au cules fracţiuni de 2 ml şi s-au determinat valorile pH-ului la temperatura de colectare (15° C) cu un pH-metru tip Radiometer PHM 63 cu electrod concentric. Eroarea de măsură a aparatului este de $\pm$ 0,01 unităţi de pH.

Spectrofotometria s-a efectuat cu un spectrofotometru Zeiss-Jena, Specord UV-Vis. Spectrele de excitaţie şi de emisie fluorescentă s-au înregistrat cu un spectrofotofluorimetru Aminco-Bowman cu rezoluţia $\pm$ 2 nm şi un înregistrator SEPHRAM-Graphispot.

Spectrele de absorbţie s-au înregistrat în domeniul în care amfoliţii absorb slab. Amfoliţii nu sînt fluorescenţi, aşa încît spectrofotofluorimetria s-a putut efectua direct pe fracţiunile extrase de pe coloana de separare.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Procedeul de extracţie la rece include în principiu trei etape : 1) macerarea ţesutului, 2) extracţia salină pentru îndepărtarea proteinelor solubile şi polizaharidelor, 3) extracţia colagenului cu o soluţie acidă cu tărie ionică mică, la rece. În general, cantitatea de colagen creşte cu scăderea pH-ului de extracţie. Metodele de extracţie acidă diferă între ele în funcţie de natura reactivilor folosiţi, de pH-ul şi de concentraţiile acestora. Cele mai vechi metode utilizau tampoane citrat cu pH-ul în domeniul 3—4,5. În lucrarea de faţă s-a folosit o metodă mai nouă (5), cu acid acetic 0,5 M, utilizată în general în vederea unor separări electroforetice.

Înainte de fracţionare s-au înregistrat spectrele de absorbţie, de excitaţie şi de emisie a CAS. Spectrul de absorbţie prezintă o bandă largă de $38-48 \times 10^3$ cm^{-1}, fără să prezinte absorbţie la 36×10^3 cm^{-1}. Spectrele de excitaţie şi de emisie sînt prezentate în figura 1. Spectrele de emisie cu $\lambda_{ex} = 340$ nm prezintă un maxim de emisie la 400 nm.

Fracţionarea izoelectrică a permis separarea colagenului acido-solubil în fracţiuni distincte. Separarea s-a făcut pe baza caracteristicilor pe sarcină electrică, respectiv în funcţie de punctele izoelectrice ale speciilor moleculare conţinute în CAS. Fracţionarea izoelectrică pe coloană lichidă permite determinarea punctelor izoelectrice fără eventuale distorsiuni datorate formei şi mărimii moleculelor, adsorbţiei la suport, legării de

ioni sau altor surse de artefacte. Separările obținute au fost verificate inversînd sensul gradientului de pH, respectiv de densitate.

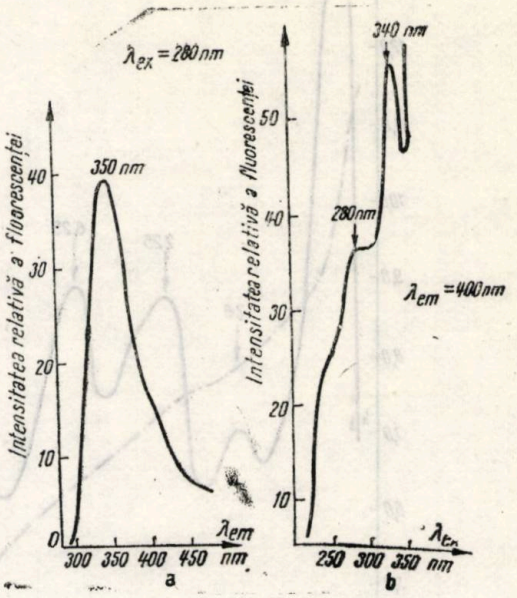


Fig. 1. — *a*, Spectrul de emisie al CAS nefracționat, cu excitație la 280 nm. *b*, Spectrul de excitație al CAS nefracționat, cu emisie la 400 nm.

Această metodă a permis separarea a șase fracțiuni bine conturate din probele noastre de CAS. În figura 2 sînt prezentate variațiile extincției la 250 nm și ale pH-ului, în funcție de numărul de fracțiuni. Fracțiunea majoră este cea cu pI 9,8, situată tocmai în zona abruptă de gradient, în care rezoluția este mai puțin bună. Pe lîngă această fracțiune majoră am mai obținut trei fracțiuni bine marcate, cu pI-urile 4,75, 6,25 și 7,25, și două fracțiuni minore, la pI 3,75 și 7,80 (tabela 1). Piscul de la 7,25 este cel mai slab focalizat și are o structură mai complexă decît celelalte piscuri, prezentînd un număr.

Rezultatele fracționărilor izoelectrice nu pot fi preluate de la un tip de colagen la altul. Spectrul izoelectric al colagenului solubilizat variază în funcție de compoziția acestuia, deci de : 1) metoda de solubilizare și 2) de sursă (6). Colagenul nativ neutro-solubil separat după punctele izoelectrice prezintă nouă fracțiuni distincte (Gabriela Angel, V. Gheorghe și Maria Caloianu-Iordăchel, date nepublicate, 1980). În funcție de vîrsta animalului din care s-a extras colagenul nativ, se observă (tabela 1) că piscurile cele mai înalte ca amplitudine sînt la pH-uri acide. Primele trei piscuri domină ca amplitudine la ambele vîrste, dar la cel bătrîn rămîn sub valorile celui tînăr. La pI 10,14, amplitudinea piscului pentru colagenul extras din animalul bătrîn este mult deasupra celui tînăr. Concluzia a fost că vîrsta animalului nu modifică numărul de fracțiuni, ci amplitudinea lor relativă și valorile pI-urilor. Se observă însă (tabela 1) că modul de solubilizare influențează atît numărul de fracțiuni (pentru CAS avem șase fracțiuni), cît și valorile pI-urilor.

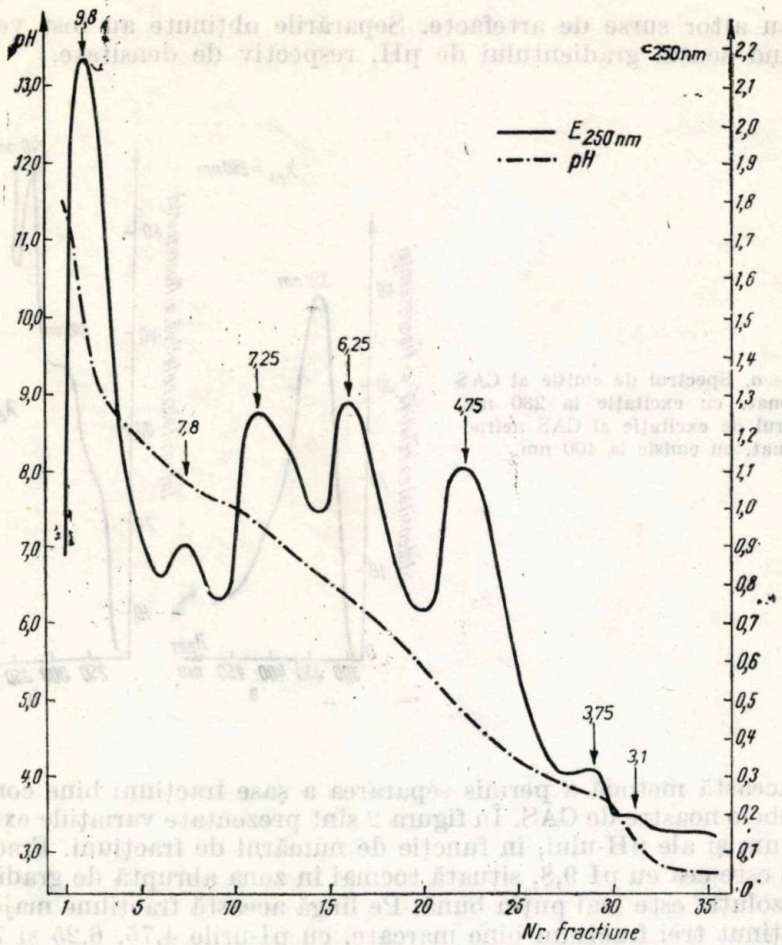


Fig. 2. — Extincția la 250 nm în funcție de numărul de fracțiuni după fracționarea izoelectrică a CAS, pe domeniul de pH 2,5—11.

Tabela 1

Valorile punctelor izoelectrice obținute prin fracționarea izoelectrică a colagenului nativ acido-solubil și neutro-solubil (6)

Tipul materialului	pH izoelectric								
Colagen acido-solubil	3,75	4,75	6,25		7,25	7,80		9,80*	
Colagen neutro-solubil (5 luni)	3,18	5,17*	6,20	6,81	7,10	7,44	8,62	8,97	9,79
Colagen neutro-solubil (26 luni)	2,83	4,98*	6,19	6,69	7,16	7,63	7,68	9,0	10,14*

* Valorile pI-urilor marcate au amplitudinea cea mai mare.

CAS fracționat prin disc-electroforeză prezintă patru fracțiuni distincte, deși metoda de solubilizare este aceeași (5). Rezultatele obținute prin disc-electroforeză și fracționare izoelectrică, deși consistente în sine, nu se pot corela direct.

Un rol important îl are și natura țesutului din care se extrage colagenul, întrucît compoziția sa primară variază în funcție de țesut. Acest fapt afectează în mod deosebit pozițiile piscurilor obținute prin fracționare izoelectrică.

Fiind o proteină din clasa A, caracteristicile de emisie și de extracție ale colagenului se datorează în principal tirozinei. Se știe însă că pot exista și alți cromofori induși de care trebuie să se țină seama. Astfel, în cazul colagenului, anumite reticulări pot constitui grupări cromofore; de asemenea s-a demonstrat existența unor grupări cromofore induse (7).

Spectrele de emisie, atît înainte de fracționare, cît și după aceea, erau dependente de lungimea de undă de excitație. După fracționare, pentru variația pH-ului de la 2,9 la 3,7, cu excitația la 280 nm, emisia prezintă o deplasare spre roșu cu 60 nm, de la 365 la 425 nm. Pentru pH $>3,7$, emisia rămîne constantă la 355 nm pentru excitația 280 nm.

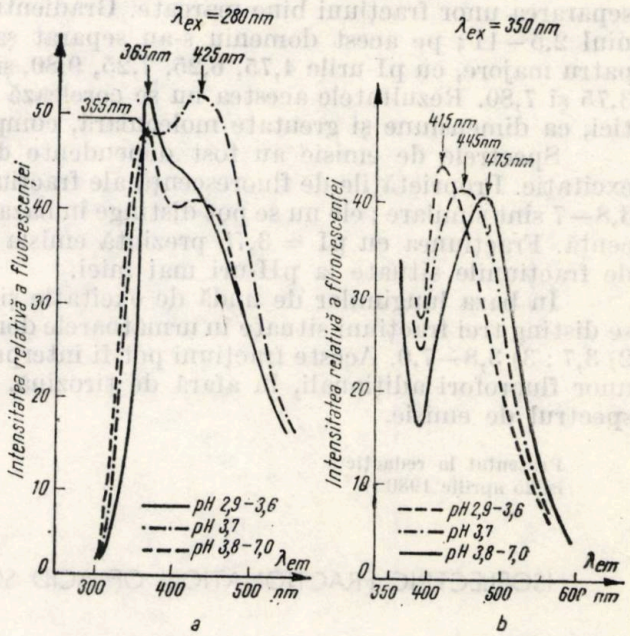


Fig. 3. — Spectrele de emisie ale fracțiunilor obținute prin focalizare izoelectrică: *a*, excitație la 280 nm; *b*, excitație la 350 nm.

Excitînd cu 350 nm, emisia se deplasează de la 415 nm (pH = 2,9) la 475 nm (pH = 3,7), deci tot o deplasare de 60 nm. Pentru pH $>3,7$, $\lambda_{ex} = 350$ nm, emisia rămîne la 475 nm.

Dependența spectrului de emisie de lungimea de undă de excitație a fost demonstrată pe diverse tipuri de colagen solubilizat, inclusiv pe CAS. Astfel, pe CAS extras din os s-a obținut o deplasare a emisiei de la 305 la 395 nm pentru excitația cu 285 nm și, respectiv, 305 nm. Această

deplasare deosebit de mare, precum şi lungimile de undă caracteristice nu se pot explica decît admiţînd prezenţa unor fluorofori adiţionali din ţesutul iniţial (8).

S-a demonstrat pentru proteine fibroase, printre care şi colagen, că emisia fluorescentă peste 350 nm, la lungimile de undă de excitaţie 250—315 nm, se poate datora excitării cromoforului C=O şi grupării peptidice (9). Lungimea de undă a maximului de fluorescenţă este dependentă şi de mediul local, acesta perturbînd stările fundamentală şi excitată ale fluoroforului. De asemenea, se cunoaşte că spectrul de emisie fluorescentă al tirozinei în proteine este heterogen, respectiv prezintă emisie la lungimi de undă mai mari decît cele normale cînd este excitată cu lungimi de undă peste 300 nm.

CONCLUZII

Colagenul solubil fiind un amestec heterogen de fragmente polipeptidice cu caracter amfoter, s-a folosit tehnica fracţionării izoelectrice pentru separarea acestora. Fracţionarea izoelectrică a colagenului acido-solubil, extras la rece cu acid acetic din tendon de coadă de şobolan, a permis separarea unor fracţiuni bine marcate. Gradientul de pH acoperea domeniul 2,5—11; pe acest domeniu s-au separat şase fracţiuni, dintre care patru majore, cu pI-urile 4,75, 6,25, 7,25, 9,80, şi două minore, cu pI-urile 3,75 şi 7,80. Rezultatele acestea nu se corelează direct cu alte caracteristici, ca dimensiune şi greutate moleculară, compoziţie în lanţuri α, β, γ.

Spectrele de emisie au fost dependente de lungimea de undă de excitaţie. Proprietăţile de fluorescenţă ale fracţiunilor situate în domeniul 3,8—7 sînt similare; ele nu se pot distinge în baza proprietăţilor de fluorescenţă. Fracţiunea cu pI = 3,75 prezintă emisia deplasată spre roşu faţă de fracţiunile situate la pH-uri mai mici.

În baza lungimilor de undă de excitaţie şi de emisie caracteristice, se disting trei fracţiuni situate în următoarele domenii de pH: 1) 2,9—3,6; 2) 3,7; 3) 3,8—7,0. Aceste fracţiuni pot fi interpretate în sensul existenţei unor fluorofori adiţionali, în afară de tirozină, care duc la deplasări în spectrul de emisie.

Prezentat la redacţie
la 25 aprilie 1980

Universitatea Bucureşti,
Facultatea de fizică

ISOELECTRIC FRACTIONATION OF ACID SOLUBLE COLLAGEN

SUMMARY

Isoelectrical focusing (IF) has been successfully used to separate the protein species contained in the acid soluble collagen (ASC). The technique of IF is well suited for the separation and study of similar proteins even if the compositional differences of the separable molecules are very small, i.e. a few amino acids. The separation was performed on the basis of the electrical charge characteristics, i.e. according to the isoelectrical points (IP) of the molecular species contained by ASC.

Absorption, excitation and emission spectra of the separated fractions are reported in comparison with the similar data of the unfractionated ASC.

UV absorption of the rat tail tendon acid soluble collagen, investigated in our experiments, evidenced six well-marked fractions. This complex isoelectrical pattern shows that ASC is a polydisperse mixture of several different molecular species.

The heterogeneity of the fluorescent emission spectra shows that ASC contains some independently emitting species possessing distinct emission properties. The emission spectra were function of the exciting wavelength, proving the heterogeneous nature of the overall emission. The excitation spectra were function of the emission wavelength due also to the presence of several different chromophores.

BIBLIOGRAFIE

1. J. C. Bernengo et al., Biochim. biophys. Acta, **532**, 305 (1978).
2. P.E. McClain et al., Biochim. biophys. Acta, **304**, 457 (1973).
3. A. V. Everitt și colab., Gerontologia, **16**, 30 (1970).
4. O. Vesterberg, Int. Labor., **3**, 61 (1978).
5. P. E. McClain et al., Int. J. Biochem., **2**, 167 (1971).
6. Maria Caloianu-Iordăchel, Gabriela Angel, V. Gheorghe, Rev. roum. Biochim., **3**, 183 (1979).
7. D. Fujimoto, Biochem. Biophys. Res. Commun., **76**, 1124 (1977).
8. M. Tsuda et al., Kitasato Arch. Exp. Med., **47**, 129 (1974).
9. H. Kallman et al., Photochem. Photobiol., **8**, 65 (1968).

ACŢIUNEA IONILOR DE LITIU, SODIU ŞI POTASIU ASUPRA FOSFATAZEI ALCALINE ŞI FOSFATAZEI ACIDE DIN DIFERITE ŢESUTURI ŞI ORGANE

VALENTINA JURCA, ANETA SILICĂ

Rezumat. Se cercetează acţiunea ionilor de Li^+, Na^+ şi K^+, *in vitro*, asupra fosfatazei alcaline cu optimum de pH = 9,2 (E.C.3.1.3.1) şi asupra fosfatazei acide cu optimum de pH = 5,4 (E.C.3.1.3.2) din creier, sînge, ficat, inimă, rinichi şi muşchi. Ionii de litiu exercită o puternică inhibiţie asupra fosfatazei alcaline cerebrale la toate concentraţiile experimentate, asupra celei din sînge numai la concentraţii mai mari, iar asupra fosfatazei de tip hepatic, de tip inimă, rinichi şi muşchi manifestă în general o acţiune de stimulare. Inhibiţia sodiului este mai redusă comparativ cu cea manifestată de litiu, iar potasiul acţionează în general numai ca stimulator al enzimei. Fosfataza acidă din ţesuturile şi organele cercetate este stimulată de ionii de litiu în concentraţii mici, iar în concentraţii mari inhibă activitatea enzimei. Sub influenţa ionilor de litiu, afinitatea fosfatazei alcaline din ţesutul cerebral pentru substrat scade. Rezultatele obţinute sugerează o corelaţie între efectul inhibitor al ionilor de litiu asupra fosfatazelor din creier, în special asupra celei alcaline, şi acţiunea lor terapeutică în tulburările nervoase.

Interesul pentru cercetarea acţiunii litiului asupra diverselor aspecte metabolice ale organismului viu a crescut în ultimul timp, datorită mai ales acţiunii sale specifice în tratamentul unor maladii nervoase la om.

Experimentările întreprinse de Cade (1) privind acţiunea litiului asupra organismelor vii au determinat pentru prima dată (1949) utilizarea sărurilor de litiu în tratamentul maladiilor nervoase. Baastrup şi Schou (2), în urma a numeroase cercetări, ajung la concluzia că litiul este un factor specific în tratamentul stărilor de manii şi hipomanii, ca şi în stările maniaco-depresive. Stanley şi colab. (3) au evidenţiat corelaţia dintre litiu şi diferite aspecte specifice ale metabolismului în tulburările psihice, arătînd, printre altele, că prezenţa clorurii de litiu modifică concentraţia catecolaminelor din sînge şi din ţesutul cerebral, crescută în manii şi scăzută în stări depresive.

Greenspan şi colab. (4) au cercetat retenţia şi distribuţia litiului, administrat sub formă de Li_2CO_3, la bolnavii maniaco-depresivi. Chesnais şi colab. (5) arată că, dacă în soluţia Ringer adăugată preparatelor izolate de inimă se substituie sodiul cu litiul, amplitudinea activităţii bioelectrice scade, iar durata biopotenţialului şi fazele ciclului nu se schimbă. Szabo (6) semnalează că litiul, administrat în primele zile de sarcină în doze de 300—465 mg/kg/zi, produce malformaţii şi moartea fetusului.

Influenţa litiului asupra organismelor vii ridică probleme care preocupă pe mulţi cercetători din diferite domenii, deoarece atît efectul terapeutic cît şi modul său de acţiune nu sînt pe deplin cunoscute.

Se presupune că litiul participă la procesele de transport activ, modificînd eficienţa pompei de sodiu prin acţiunea exercitată asupra ATP-azei din membrana celulară.

În scopul furnizării energiei de transport de către sistemul enzimatic respectiv sînt necesari ionii de sodiu şi potasiu pentru orientarea spaţială a proteinei active, ionii de potasiu fiind dirijaţi la exterior, iar cei de sodiu către interior. Prezenţa altor ioni poate altera starea de echilibru necesară unei funcţionări normale a pompelor celulare, provocînd acumularea lor în interiorul celulelor. Presupunem că această acumulare ar influenţa anumite sisteme enzimatice, modificînd tipul de metabolism.

Pe baza acestor considerente şi cu scopul de a stabili o corelaţie între acţiunea terapeutică a litiului în diferite psihoze şi mecanismul prin care el influenţează metabolismul cerebral, am urmărit *in vitro* efectul său faţă de fosfataza alcalină cu optimum de pH = 9,2 şi faţă de fosfataza acidă cu optimum de pH = 5,4 din creier, sînge, ficat, rinichi, inimă şi muşchi, importanţa acestor enzime fiind direct legată de rolul considerabil jucat de esterii şi anhidridele fosforice în metabolismul intermediar.

MATERIAL ŞI METODE

Ca surse de enzime s-au utilizat globule roşii şi plasmă sanguină de sînge uman (obţinut de la Centrul de recoltare şi conservare a sîngelui din Iaşi), creier, muşchi, ficat, rinichi şi inimă de la şobolani albi, linia Gustav, în greutate de 250—300 g. Sîngele a fost recoltat pe heparină drept anticoagulant. Plasma s-a separat de globule prin centrifugare la 3000 rotaţii/min. Liza globulelor s-a realizat cu apă bidistilată. Extractele enzimatice din muşchi şi din organele luate în studiu s-au obţinut în urma triturării şi omogenizării ţesuturilor cu soluţie tampon TRIS, pH = 7, în proporţie de 1/2,5 greutate/volum. Omogenatele au fost ţinute 12 ore la + 4° C, după care s-au centrifugat timp de 30 min la 4000 rotaţii/min. Supernatantele perfect limpezi, obţinute prin recentrifugare la 5000 rotaţii/min timp de 20 min, au servit ca sursă de enzime. Determinarea activităţii fosfatazei alcaline s-a făcut prin dozarea fosforului liberat în urma hidrolizei beta-glicerofosfatului, respectiv a alfa-glicerofosfatului în cazul fosfatazei acide, utilizîndu-se metoda Fiske-Subbarow (7). Rezultatele s-au calculat în micromoli P/mg prot/oră şi s-au exprimat în creşterea (+) sau în scăderea (—) % faţă de martori. Proteinele au fost determinate prin metoda Lowry (8). Concentraţia proteică a extractelor enzimatice adăugate în mediul de incubaţie a fost aceeaşi. Experienţele s-au efectuat în condiţii similare cu cele dintr-o lucrare anterioară (9), în absenţa şi în prezenţa unor cantităţi variabile de LiCl, cuprinse între 0,025 şi 16,32 mM. Pentru comparaţie s-a urmărit efectul ionilor de Na^+ şi K^+.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele referitoare la acţiunea litiului asupra fosfatazei alcaline din creier, plasmă, eritrocite, ficat, rinichi şi muşchi sînt redate în figura 1. Rezultatele obţinute arată că sensul de acţiune al acestui ion asupra enzimei este în funcţie de natura enzimei şi de concentraţia ionilor de litiu adăugaţi în mediul de incubaţie.

În cazul fosfatazei alcaline din creier, concentraţiile de litiu, cuprinse între 0,025 şi 16,32 mM, au manifestat acţiune inhibitoare, care s-a accentuat treptat cu creşterea concentraţiei ionilor de litiu, încît la concentraţia de 16,32 mM aproximativ 84% din activitatea enzimei este diminuată.

Activitatea fosfatazei alcaline din plasma sanguină este uşor stimulată de concentraţii mici de litiu (0,025—0,050 mM), efect ce diminuează cu creşterea concentraţiei acestui ion. De la concentraţia de 0,200 mM,

litiul inhibă treptat activitatea enzimei, care, la concentrația litiului de 16,32 mM, scade aproximativ 50% în comparație cu martorul. Asupra fosfatazei alcaline din eritrocite litiul acționează în același sens ca și în cazul celei din plasma sanguină, cu deosebirea că acțiunea sa de inhibare începe la o concentrație mai mare (0,400 mM).

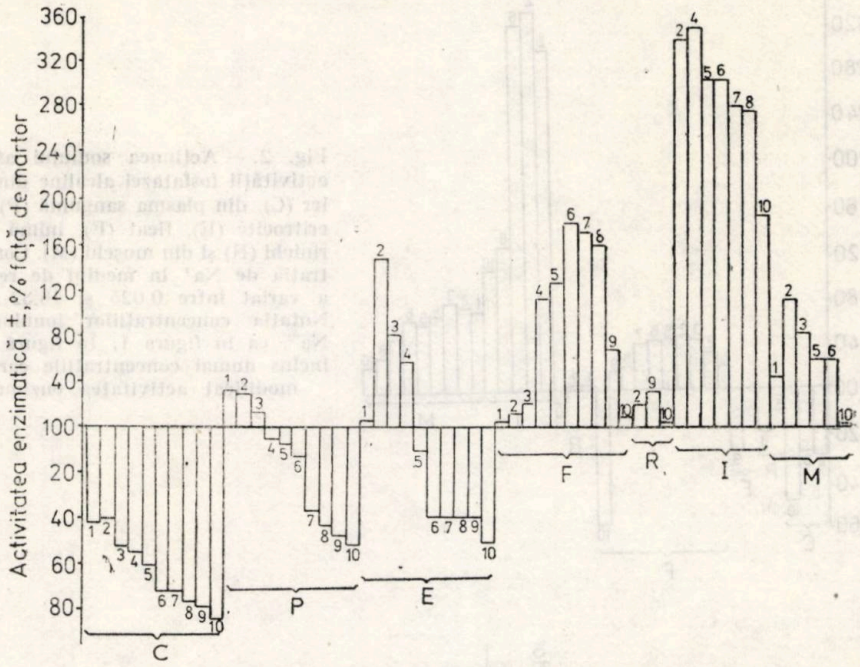


Fig. 1. — Acțiunea litiului asupra activității fosfatazei alcaline din creier (C), din plasma sanguină (P), din eritrocite (E), ficat (F), inimă (I), rinichi (R) și mușchi (M). Concentrația milimolară în Li^+: 0,025(1); 0,050(2); 0,100(3); 0,200(4); 0,400(5); 0,800(6); 1,16(7); 2,02(8); 4,08(9); 16,32(10).

Activitatea fosfatazei alcaline din ficat, rinichi, inimă și mușchi este stimulată de ionii de litiu în concentrații mici, iar în concentrații mari, care depășesc anumite limite, acțiunea lor de stimulare scade diferențiat cu natura enzimei. Astfel, efectul de potențare al litiului începe să scadă în cazul fosfatazei alcaline din mușchi la concentrația de 0,100 mM, în cazul celei din inimă la 0,400 mM, la cea de tip hepatic la concentrația de 1,16 mM, iar în cazul fosfatazei renale acest efect se exercită la o concentrație mult mai mare (16,32 mM).

Ionii de sodiu manifestă o acțiune inhibitoare mai redusă asupra fosfatazei alcaline din creier, plasmă și hematii, iar asupra celei din ficat, rinichi, inimă și mușchi acționează în același sens ca și ionii de litiu, cu excepția concentrației de 16,32 mM, care produce inhibarea enzimei din rinichi și din ficat (fig. 2).

Potasiul manifestă în general (fig. 3) o acțiune de stimulare a activității acestei enzime din țesuturile cercetate, cu remarca faptului că în concentrațiile mici, cuprinse între 0,025 și 2,02 mM, nu a prezentat nici o acțiune asupra enzimei din creier și din sînge.

În figura 4 sînt redate rezultatele privind acţiunea ionilor de litiu asupra fosfatazei acide cu optimum de pH = 5,4 din ţesuturile şi organele cercetate. Se constată că litiul în concentraţii cuprinse între 0,025 şi

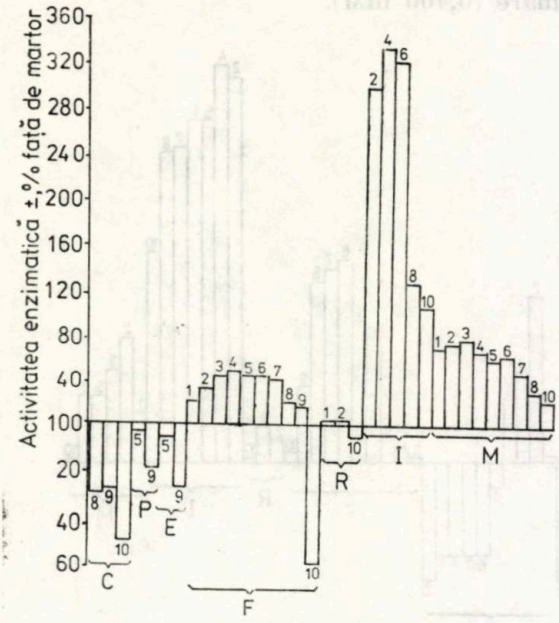


Fig. 2. — Acţiunea sodiului asupra activităţii fosfatazei alcaline din creier (C), din plasma sanguină (P), din eritrocite (E), ficat (F), inimă (I), rinichi (R) şi din muşchi (M). Concentraţia de Na^+ în mediul de reacţie a variat între 0,025 şi 16,32 mM. Notaţia concentraţiilor ionului de Na^+, ca în figura 1. În figură s-au inclus numai concentraţiile care au modificat activitatea enzimei.

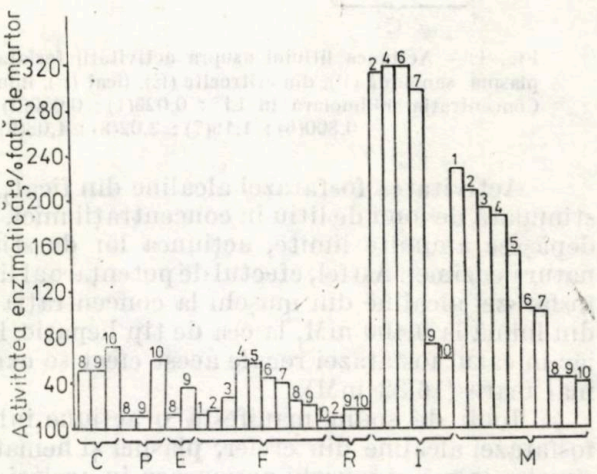


Fig. 3. — Acţiunea potasiului asupra activităţii fosfatazei alcaline din creier (C), din plasma sanguină (P), din eritrocite (E), ficat (F), rinichi (R), inimă (I) şi muşchi (M). Concentraţia ionilor de K^+ în mediul de reacţie a variat între 0,025 şi 16,32 mM. Notaţia concentraţiilor ionului de K^+, ca în figura 1. În figură s-au inclus numai concentraţiile care au modificat activitatea enzimei.

0,400 mM a stimulat activitatea enzimei din creier şi numai în concentraţii mai mari (1,60—16,32 mM) prezintă acţiune inhibitoare. Asupra fosfatazei acide din eritrocite, ficat, rinichi, inimă şi muşchi, litiul a acţionat în acelaşi sens ca şi asupra enzimei cerebrale, cu deosebirea că acţiunea inhibitoare a ionilor de litiu s-a manifestat la o concentraţie mai

mică în cazul enzimei din globulele roșii și la concentrații mai mari în cazul celei din rinichi, inimă și mușchi (2,020 și, respectiv, 16,32 mM), iar asupra enzimei din ficat a exercitat numai o ușoară acțiune de diminuare.

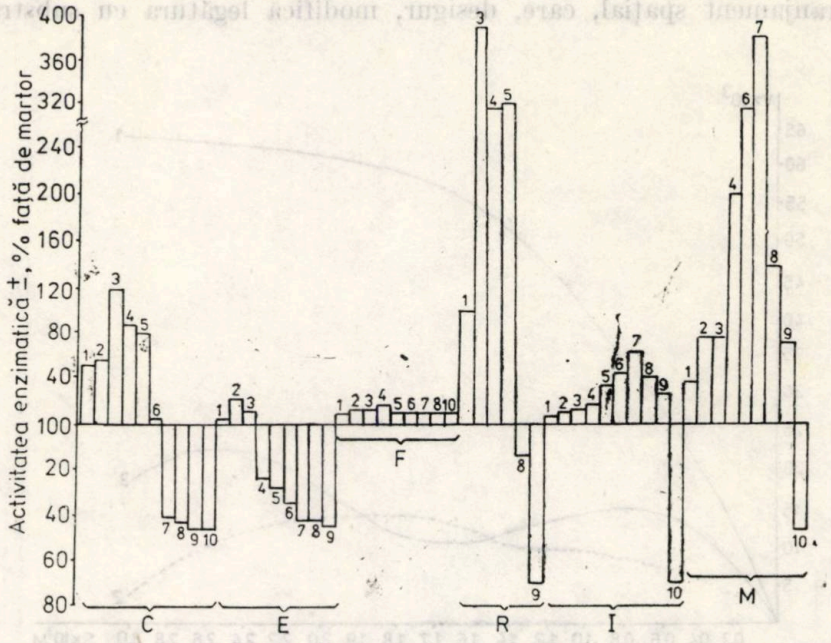


Fig. 4. — Acțiunea litiului asupra activității fosfatazei acide din creier (C), eritrocite (E), ficat (F), rinichi (R), inimă (I) și mușchi (M). Concentrația ionilor de Li^+ în mediul de reacție a variat între 0,025 și 16,32 mM. Notația concentrațiilor ionilor de Li^+, ca în figura 1.

Susceptibilitatea diferențiată a activității fosfatazei alcaline și a celei acide din țesuturi și organe diferite față de ionii de litiu indică variații ale anumitor proprietăți moleculare ale proteinei enzimelor.

Conform teoriilor actuale, între substrat și efectori pot avea loc reacții cooperative ce provoacă o modificare conformațională a proteinei enzimatice. Pentru a pune în evidență asemenea schimbări se trasează curbele care reprezintă variația activității cu concentrația substratului, cu și fără efectori.

Trasîndu-se aceste curbe în cazul fosfatazei alcaline din creier, s-au obținut rezultatele prezentate în figura 5.

După cum se vede, în cazul probei martor, curba are un aspect hiperbolic, ceea ce înseamnă că este o reacție monomoleculară de ordinul 1, care urmează legile simple ale lui Michaelis. La probele la care s-a adăugat LiCl în concentrații diferite, curbele prezintă un aspect sigmoid, dovedind că are loc o schimbare a conformației proteinei enzimatice.

Această constatare prezintă o mare importanță, deoarece se știe că litiul face parte din elementele cu masă atomică sub 50, care de obicei sînt activatoare. Cu toate că atomul său are masa și sarcina electrică reduse,

totuşi el se combină cu enzima cu uşurinţă şi formează complexul fosfatază — Li, micşorînd astfel afinitatea enzimei pentru substrat. Prin complexarea cu enzima, sînt susceptibile deformarea edificiului macromolecular specific al proteinei active şi apariţia unei structuri noi, cu un alt aranjament spaţial, care, desigur, modifică legătura cu substratul.

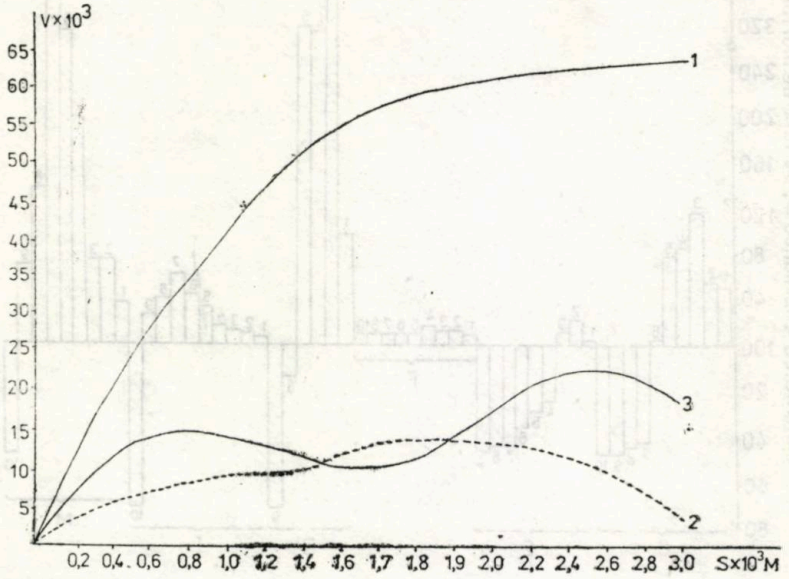


Fig. 5. — Variaţia activităţii fosfatazei alcaline cerebrale cu concentraţia în substrat.
1, martor; *2*, cu 0,200 mM Li^+; *3*, cu 0,800 mM Li^+.

Scăderea activităţii fosfatazei şi modificarea cineticii ei provoacă o micşorare a energogenezei prin blocarea fosfaţilor ca esteri şi, în consecinţă, o carenţă în grupări fosforil necesare multor procese metabolice. Această părere coincide cu observaţia lui Dousa şi Hechter (10), după care litiul este un inhibitor specific al enzimelor ce intervin în formarea adenozinmonofosfatului ciclic din ţesutul cerebral.

Aşa cum au arătat Hertz şi Schou (11), sărurile de litiu stimulează iniţial respiraţia cortexului cerebral, prin activarea glicolizei aerobe şi inhibarea sintezei ATP-ului şi creatin-fosfatului.

Corelînd rezultatele obţinute cu cele dintr-o lucrare anterioară (12) referitoare la acţiunea litiului asupra fosforilării oxidative şi cu constatările diverşilor autori, putem spune că litiul provoacă o decuplare temporară a proceselor de fosforilare şi oxidare.

Prin inhibarea fosfatazelor de către ionii de litiu, are loc o scădere a concentraţiei în ortofosfat şi ATP, necesari glicolizei anaerobe, care este diminuată în favoarea glicolizei aerobe. Presupunem că prin aceste mecanisme litiul acţionează ca un cofactor al enzimelor reglatoare, readucînd la normal în mare parte principalele procese metabolice din creier, tulburate în cursul stărilor maniaco-depresive.

Ca atare, se poate presupune că efectul terapeutic al litiului în afecțiunile nervoase se datorește modificării metabolismului specific, prin acțiunea exercitată asupra unor enzime implicate în dinamica fosfaților cerebrali.

CONCLUZII

Fosfatazele alcaline din creier și din sînge sînt inhibate de unele metale ușoare cu masa atomică sub 50, care în mod obișnuit sînt activatoare.

În seria metalelor alcaline, inhibiția scade cu cît caracterul electropozitiv se accentuează. Astfel, litiul are un efect puternic inhibitor, sodiul este mai slab inhibitor, iar potasiul nu are acțiune sau activează enzima.

Față de fosfatazele de tip hepatic, de tip inimă, rinichi și mușchi, atomii acestor elemente manifestă în general o acțiune de stimulare, exceptînd sodiul, care în concentrație mare inhibă ușor activitatea enzimei din rinichi și ficat.

Asupra fosfatazei acide din țesuturile și organele cercetate, ionii de litiu în concentrații mici exercită un efect stimulator, iar în concentrații mari inhibă activitatea enzimei, cu excepția celei hepatice, pe care numai o diminuează ușor.

Sub acțiunea ionilor de litiu, afinitatea fosfatazei alcaline cerebrale pentru substrat scade.

Rezultatele obținute ar putea explica acțiunea terapeutică a litiului în tratamentul unor afecțiuni nervoase prin inhibiția unor enzime care intervin în dinamica fosfaților cerebrali și modificarea tipului de metabolism din țesutul nervos.

Prezentat la redacție
la 23 aprilie 1980

Universitatea „Al. I. Cuza", Iași,
Laboratorul de chimie

THE EFFECT OF Li^+, Na^+ AND K^+ IONS ON ALKALINE AND ACID PHOSPHATASE FROM DIFFERENT TISSUES AND ORGANS

SUMMARY

The *in vitro* effect of Li^+, Na^+, and K^+ ions was investigated on the alkaline (optimum pH=9.2) and on the acid phosphatase (optimum pH = 5.4) from the brain, blood, liver, heart, kidneys and muscles.

The lithium ions strongly inhibit the cerebral alkaline phosphatase at all concentrations used (0.025—16.32 mM), the blood phosphatase at large concentrations only, and they generally have a stimulus effect on the phosphatase from the liver, heart, kidneys and muscles.

The inhibitory action of sodium is more reduced as compared with that of lithium, and potassium generally acts as a stimulator of the enzyme only. The acid phosphatase in the tissues and organs investigated is stimulated by small concentrations and inhibited by high concentrations of lithium ions.

The affinity for the substrate of the cerebral alkaline phosphatase decreases under the influence of lithium ions.

It was suggested a relationship between the inhibitory effect of lithium ions on the cerebral phosphatase and its therapeutic action in the manic-depressive psychosis through metabolic changes.

BIBLIOGRAFIE

1. J. F. J. Cade, Med. J., *2*, 349 (1949).
2. P. C. Baastrup, M. Schou, Arch. gen. Psychiat., **16**, 162 (1967).
3. R. Stanley, M. B. Platman, R. Ronald, U. D. Fieve, Arch. gen. Psychiat., **19**, *6*, 659 (1968).
4. K. Greenspan, F. K. Goodwin, W. E. Bunney, J. Durell, Arch. gen. Psychiat., **19**, *6*, 664 (1968).
5. J. M. Chesnais, M. P. Sauviat, I.M. Vassas, J. Physiol. (Paris), **61** Suppl., *2*, 224 (1969).
6. K. K. Szabo, Nature (London), **225**, 73 (1970).
7. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
8. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
9. V. Jurca, An. ştiinţ. Univ., s. I, **XIV**, fasc. 1, 113 (1968).
10. Th. Dousa, O. Hechter, citat după New Scientist, **46**, *698*, 166 (1970).
11. L. Hertz, M. Schou, Biochem. J., **85**, 93 (1962).
12. V. Jurca, St. cerc. biochim., **16**, *3*, 295 (1973).

MODIFICĂRILE PATOLOGICE ALE UNOR PROTEINE PLASMATICE ÎN HEPATOPATIILE CRONICE

VICTORIA PITULICE, C. BOGDAN

Rezumat. Autorii cercetează comparativ modificările patologice ale unor proteine în hepatopatiile cronice pe loturi de adulţi şi vîrstnici — bărbaţi şi femei. Proteinele studiate au fost serumalbumina, globulinele α_1, α_2, β, γ, imunoglobulinele Ig A, Ig G, Ig M. S-a constatat că are loc o scădere a albuminelor şi o creştere a globulinelor, în special a gamma-globulinelor, atît în lotul de adulţi cît şi de vîrstnici. De asemenea s-a observat o creştere a imunoglobulinelor faţă de valorile lor normale. Aceste modificări diferă, pe de o parte, în funcţie de evoluţia bolii, iar pe de altă parte în funcţie de vîrstă şi sex. Se constată la bolnavii vîrstnici o creştere mai accentuată a gamma-globulinelor şi a imunoglobulinelor faţă de bolnavii adulţi şi o scădere mai pronunţată a albuminelor la bolnavii vîrstnici faţă de bolnavii adulţi.

Patologia hepatică se bucură în ultimii ani de un interes crescînd, pe de o parte datorită frecvenţei în creştere a bolilor de ficat, iar pe de altă parte progreselor remarcabile care s-au făcut în cunoaşterea fiziopatologiei hepatice în general, a hepatitelor cronice în special (1). Mult timp, oamenii de ştiinţă s-au întrebat dacă conceptul de hepatită cronică nu corespunde unei entităţi heterogene. În 1966, Schiff arată că pînă în 1963 hepatitele cronice nu formau obiect de studiu (2). Mai tîrziu, în 1969, după cum semnalează Buligescu (1), a fost descrisă hepatita cronică. La ce interval după hepatita virotică acută se poate vorbi de cronicizarea leziunilor? Saukali şi colab. (3) îl consideră a fi de trei luni, Fodor şi colab. (4) de opt luni, iar Buligescu (1) îl consideră variabil după starea de îmbolnăvire a ficatului. Pe plan clinic, cronicizarea se traduce prin indurarea ficatului, persistenţa şi creşterea gamma-globulinelor şi apariţia manifestărilor imunologice (5). Avînd în vedere cele arătate, ne-am propus să urmărim modificările unor fracţiuni proteice în hepatitele cronice, comparativ la bolnavii vîrstnici şi adulţi — femei şi bărbaţi —, care au fost raportate la valorile normale ale acestor fracţiuni.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările s-au făcut pe un lot restrîns de bolnavi — 40 de cazuri de hepatită cronică. Datorită dificultăţilor ce există în stabilirea evoluţiei bolii, pe de o parte, iar pe de altă parte asociaţiei cu alte afecţiuni, cum ar fi pancreatita cronică, gastrita cronică, ulcerul gastroduodenal, a trebuit să se elimine din lotul în observaţie 4 cazuri. Deci, determinările s-au făcut pe 36 de bolnavi cu hepatopatii cronice, repartizaţi pe grupe de vîrstă în două subloturi : unul format din 25 de bolnavi, a căror vîrstă era cuprinsă între 60 şi 85 de ani, dintre care 15 femei şi 10 bărbaţi, iar celălalt format din 11 bolnavi adulţi, a căror vîrstă era cuprinsă între 24 şi 50 de ani, dintre care 9 femei şi 2 bărbaţi. După cum se vede, lotul este foarte heterogen în ceea

ce priveşte repartizarea pe vîrstă şi sex, deoarece recunoaşterea hepatitelor cronice este un proces complex şi adeseori dificil, 50% din cazurile de hepatită cronică fiind latente clinic (6), (7).

Criteriile folosite în selectarea cazurilor au fost examenul de laborator şi observaţiile clinice. Testele funcţionale concordă în general cu diagnosticul clinic în 82% din cazuri.

Prelevarea s-a făcut *à jeune* în mai multe etape în decurs de o săptămînă. Pentru a urmări modificările proteinelor sanguine s-au dozat proteinele totale prin metoda Gornall (8); separarea lor s-a realizat prin electroforeză pe hîrtie Wattman nr. 1, migrare lentă, iar determinarea fracţiunilor proteinogramei s-a realizat prin eluţie cu NaOH 0,1 N (9). Pentru determinarea imunoglobulinelor s-a folosit imunodifuzia radială Mancini (9) pe imunoplăci Beiringwerke şi ser uman de referinţă, aparţinînd Institutului „Dr. I. Cantacuzino". Exprimarea rezultatelor s-a făcut în UI/ml, iar valorile normale au fost stabilite după indicaţiile Institutului „Dr. I. Cantacuzino" (9).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Proteinele sînt constituenţii fundamentali ai substanţei vii, ele fiind răspunzătoare de specificitatea de organ, ţesut, specie. Proteinemia reprezintă doar aproximativ starea metabolismului proteic global, deoarece în diverse afecţiuni au loc modificări neconcordante ale concentraţiilor principalelor fracţiuni.

Valorile proteinelor totale sînt cuprinse între 6,5 şi 7,5 g % (10). Urmărindu-se modificarea proteinelor totale în lotul studiat, s-a constatat că, din totalul cazurilor, 19,4% au valori pentru proteinele totale sub limita inferioară, iar 80,6% se prezintă cu valori chiar la limita inferioară (fig. 1). Determinînd valorile proteinelor totale la un număr de 100 de persoane vîrstnice, internate în Spitalul şi căminul-spital Berceni, fără afecţiuni ce generează disproteinemii, s-au găsit valori ce nu depăşesc 7 g %.

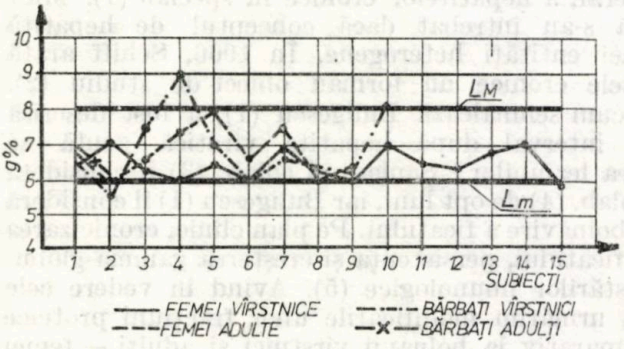


Fig. 1. — Modificarea proteinelor totale în hepatopatii cronice.

Este cunoscut că ficatul este singurul organ ce sintetizează albumina, care, odată sintetizată, este transportată prin reticulul endoplasmatic la aparatul Golgi şi de acolo în sinusoidele hepatice.

În hepatitele cronice, sinteza albuminelor este în general mult mai modificată decît catabolismul lor. Albuminele, ale căror valori normale reprezintă 50—59 g din proteinele serice totale (10) (fig. 2), în lotul studiat sînt mult sub limita inferioară, la un număr de 35 de bolnavi reprezentînd 98%. În valori absolute, normalul pentru albumină este cuprins între

3,5 și 5,5 g/100 ml (10). În determinările pe care le-am efectuat pe lotul studiat, 34 din cei 36 de bolnavi, adică 94,4 %, au prezentat valori sub limita inferioară și 5,6 % au prezentat valori în limite normale (fig. 3). În ceea ce privește modificarea cantitativă a albuminelor în funcție de vîrstă, s-a constatat o scădere pronunțată la persoanele în vîrstă față de cele adulte.

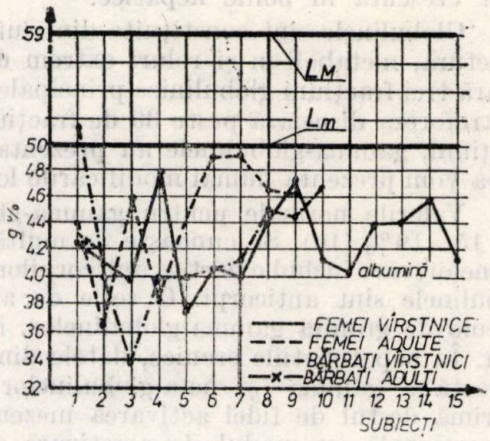


Fig. 2. — Valorile relative ale proteinelor în hepatopatii cronice.

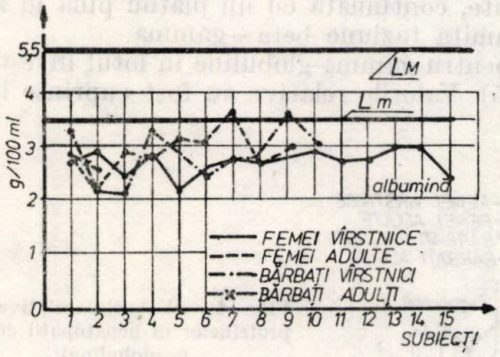


Fig. 3. — Valorile absolute ale proteinelor în hepatopatii cronice.

Femeile în vîrstă, după cum reiese din figura 3, prezintă în totalitate valori scăzute pentru albumină, în jur de 3 g/100 ml, iar din totalul de 10 bărbați vîrstnici, 6, respectiv 60 %, au prezentat valori sub 3 g/100 ml. Urmărindu-se modificările albuminei cu altă ocazie pe un lot de 100 de bătrîni fără afecțiuni ce implică modificări cantitative sau calitative ale proteinelor, în condiții de regim alimentar s-au obținut valori moderat scăzute ale albuminelor serice, compensate de valori crescute ale tuturor fracțiunilor globulinice. Studiindu-se metabolismul serumalbuminei cu ^{131}I la bătrîni (11), s-a constatat o diminuare netă a albuminei plasmatice, datorită capacității scăzute de sinteză hepatică, dar și altor cauze, ca alterarea absorbției intestinale sau a noului echilibru dinamic ce se stabilește la persoanele vîrstnice între sinteza albuminei și catabolismul acesteia.

Valorile obţinute de noi pentru albumină în afecţiuni hepatice cronice corespund cu cele ale altor cercetători. Buligescu (1) a găsit valori de 3,5—3,6 g% şi arată că scăderea albuminei la 3 g% reprezintă leziuni severe greu de compensat. Isselbacher şi Lamont (12) arată că urmărirea serumalbuminei are valoare de ghid şi prognoză.

Dacă albuminele sînt foarte scăzute, valoarea globulinelor, care în mod normal este cuprinsă între 2,5 şi 3,5 g/100 ml, adică 35—45%, este mult crescută în bolile hepatice.

Globulinele sînt constituite dintr-un număr de fracţiuni cu origine, structură, metabolism şi roluri extrem de diferite. Electroforeza clasică separă trei fracţiuni globulinice principale (alfa, beta, gamma), iar imunoelectroforeza disociază peste 30 de fracţiuni proteice. Dintre toate aceste fracţiuni, gamma-globulinele au prezentat valorile cele mai scăzute; de aceea vom prezenta numai modificările lor.

Valorile normale pentru gamma-globuline sînt 1,1—1,5 g/100 ml sau 15—19% (10). Se cunoaşte de multă vreme compoziţia gamma-globulinelor, care includ o parte a anticorpilor circulanţi; dar nu toate gamma-globulinele sînt anticorpi. O serie de anticorpi migrează electroforetic dincolo de graniţa gamma-globulinelor, intrînd în domeniul globulinelor beta. În hepatopatiile cronice, datele din literatură (13) arată o creştere marcată a gamma- şi beta-globulinelor. Creşterea gamma-globulinelor exprimă destul de fidel activarea mezenchimului hepatic şi este direct proporţională cu gradul de reactivare a mezenchimului. În hepatitele cronice şi în ciroze apare o creştere policlonală a gamma-globulinelor, sub forma unei curbe înalte şi lărgite, continuată cu un platou pînă în zona beta, ceea ce realizează aşa-numita fuziune beta—gamma.

Valorile obţinute de noi pentru gamma-globuline în lotul investigat au fost net crescute (fig. 4 şi 5). Valorile relative au fost cuprinse între

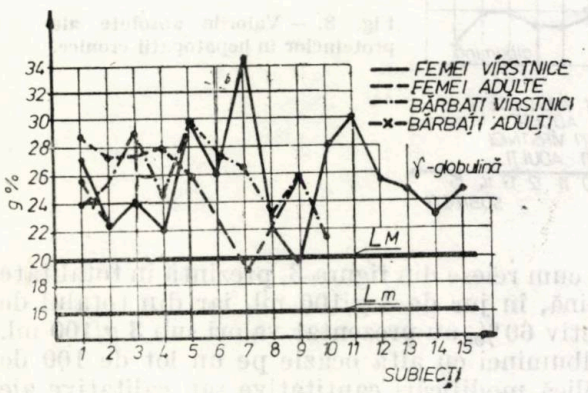


Fig. 4. — Valorile relative ale proteinelor în hepatopatii cronice (γ-globulina).

20 şi 30 g% la un număr de 31 de bolnavi, reprezentînd 86%, iar 5,6% au prezentat valori în limite normale şi 8,4% valori în jurul a 30 g% pentru gamma-globuline (fig. 4). Valorile absolute ale gamma-globulinelor, raportate la proteina totală a fiecărui bolnav în parte, se prezintă astfel (fig. 5): 33,6% au avut valori clinice normale, cu orientare către limita superioară a valorii, iar restul cazurilor au avut valori crescute în jur de

1,9 g/100 ml. În hepatitele cronice, după cum arată literatura de specialitate, valorile absolute ale gamma-globulinelor nu depășesc 2 g/100 ml (1), în timp ce în forma zisă agresivă depășesc cifra medie de 2,19 g/100 ml, în forma Waldenström depășesc 3 g/100 ml, iar în ciroza hepatică 2,63 g/100 ml (1).

Acestor hipergammaglobulinemii le corespunde o creștere a imunoglobulinelor serice, a căror investigare este absolut necesară pentru previzi-

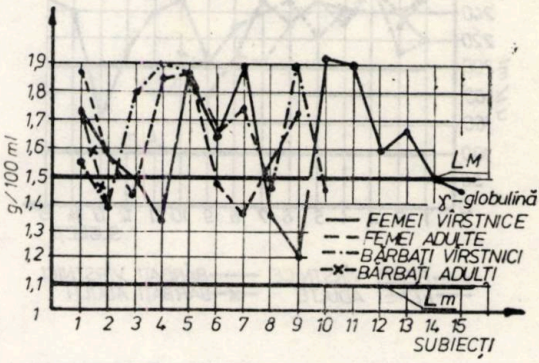


Fig. 5. — Valorile absolute ale proteinelor în hepatopatii cronice (γ-globulina).

bilitatea cronicizării hepatitei. Conceptul de imunoagresiune în perpetuarea hepatitei se bucură astăzi de un credit deosebit.

O lipoproteină anormală (lipoproteina X) cu un conținut bogat de colesterol neesterificat și fosfolipide apare în serul a 45% dintre bolnavii cu hepatopatii colestatice, în 79% din cazurile cu obstrucție extrahepatică și în 48% în colestaze intrahepatice (14). Destul de recent, Ritland a arătat că prin determinarea cantitativă a lipoproteinei X se pot face diferențieri între colestaza extrahepatică și cea intrahepatică (15).

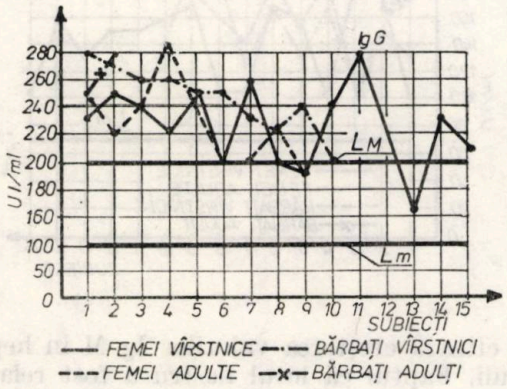


Fig. 6. — Modificările imunoglobulinelor în hepatopatii cronice (Ig G).

Investigația imunologică s-a realizat determinîndu-se imunoglobulinele prin imunodifuzia radială tip Mancini (9). Valorile obținute pentru Ig G se prezintă astfel : 72,9% au avut valori peste limita superioară, iar 27,1% au prezentat valori în limite normale, cu o deviere spre limita superioară (fig. 6). Valorile normale pentru Ig G sînt cuprinse între 100 și 200 UI/ml.

Pentru Ig A, valorile normale, care au fost stabilite după aceleaşi indicaţii, sînt cuprinse între 70 şi 200 UI/ml. La lotul în care s-au efectuat investigaţiile, rezultatele se prezintă astfel : 75,6% au avut valori peste 200 UI/ml şi 24,4% au prezentat valori în limite normale (fig. 7).

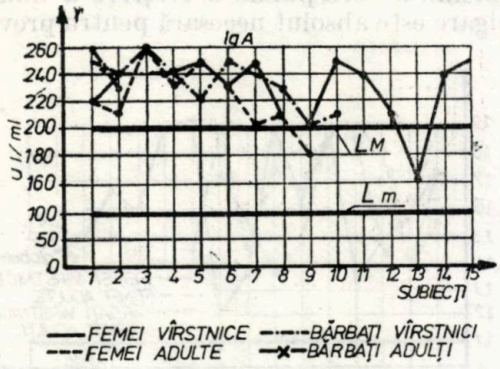


Fig. 7. — Modificările imunoglobulinelor în hepatopatii cronice (Ig A).

Conform instrucţiunilor Institutului „Dr. I. Cantacuzino", în ceea ce priveşte valorile Ig M, care sînt cuprinse între 100 şi 200 UI/ml, deşi nu au prezentat modificări foarte mari, la lotul în care s-au efectuat investigaţiile s-a constatat totuşi o deviere spre limita superioară la 47,2% din totalul cazurilor cu hepatită cronică (fig. 8).

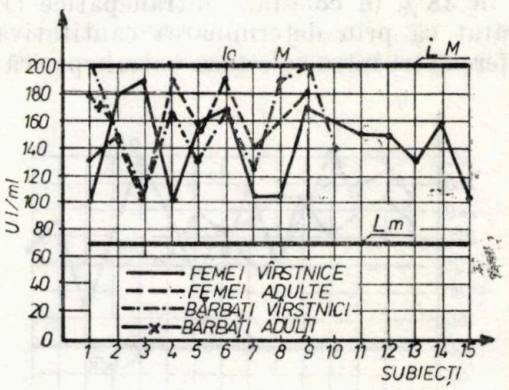


Fig. 8. — Modificările imunoglobulinelor în hepatopatii cronice (Ig M).

Literatura de specialitate citează creşterea valorilor Ig M în hepatitele cronice cu hiperproteinemii. Faptul că lotul nostru a fost relativ mic şi că din numărul total de cazuri investigate numai doi au fost bătrîni cu hipoproteinemii poate explica de ce nu am obţinut valori tot atît de ridicate ca pentru celelalte imunoglobuline, dar aceasta nu înseamnă că valorile nu sînt crescute, dat fiind că ele se află la limita superioară a normalului (200 faţă de 100, cît este limita inferioară).

Fodor şi colab. (4) găsesc creşteri importante ale imunoglobulinelor în hepatitele cronice, fără a prezenta diferenţe semnificative în diversele

stadii ale acestora. Buligescu (1), efectuînd peste 400 de imunoelectroforeze în hepatitele cronice, constată în general creşterea Ig G, Ig A şi Ig M, predominînd Ig G, precum şi creşterea β_2 M şi β_2 C şi scăderea albuminei.

Interpretarea perfectă nu a fost realizată datorită grupelor foarte heterogene, deoarece noi am reţinut numai acele hepatite cronicizate stabilizate cu o simptomatologie specifică.

Pe grupe de vîrstă se constată o predominanţă în creşterea imunoglobulinelor la bătrîni faţă de adulţi. Pe marginea acestor probleme se discută mult la ora actuală, datele fiind foarte controversate.

Hipergammaglobulinemia vîrstnicilor sănătoşi este explicată de unii cercetători (11) ca o ripostă a organismului faţă de scăderea albuminelor, în scopul menţinerii constante a presiunii coloidosmotice. Alte opinii consideră că hipergammaglobulinemia ar fi expresia continuei şi îndelungatei stimulări a sistemului imunitar al organismului de către agenţii infecţioşi (16).

Cercetările consacrate fenomenelor umane de autoimunitate au arătat marea frecvenţă cu care anticorpii cu funcţii de autoanticorpi sînt observaţi la bătrîni, deseori în absenţa oricăror manifestări clinice evocatoare de boli prin autoimunizare. Rezultatele obţinute în domeniul autoimunităţii au suscitat un interes crescînd pentru biologia senescenţei. O serie de cercetători de prestigiu (16) au atribuit proceselor autoimune un rol important în patologia îmbătrînirii. Proteinele organismului sînt în permanentă descompunere în aminoacizii lor constituenţi, care pot fi reutilizaţi *in situ* sau eliberaţi în sînge pentru a fi transportaţi în ficat sau în alte ţesuturi unde se efectuează sinteza proteică.

CONCLUZII

Ficatul reprezintă sediul major al sintezei unor proteine, cum ar fi albumina, fibrinogenul, alfa- şi beta-globulinele. Gamma-globulinele nu se găsesc în hepatocit decît în hepatitele cronice şi în ciroze.

În afecţiunile hepatice cronice, valorile relative şi absolute ale albuminelor sînt scăzute. Scăderea este mai evidentă la persoanele vîrstnice decît la cele adulte.

Valorile relative şi absolute ale gamma-globulinelor sînt crescute, aceste creşteri fiind direct proporţionale cu gradul de reactivare mezenchimală.

În raport cu vîrsta, se constată o creştere mai mare la persoanele vîrstnice faţă de adulţi.

Toate cele trei categorii de imunoglobuline au prezentat valori crescute, cu o predominanţă în creşterea valorilor la persoanele vîrstnice datorită proceselor autoimune.

Prezentat la redacţie
la 30 noiembrie 1979

Spitalul şi căminul-spital Berceni

PATHOLOGICAL CHANGES OF SOME PROTEINS IN CHRONIC PLASMATICAL HEPATITIS

SUMMARY

The authors study comparatively the pathological changes of some proteins in chronic hepatitis on a group of 36 patients — men and women — divided into two subgroups: 25 aging persons and 11 adults.

The investigated proteins were: serum albumin, globulins α_1, α_2, β, γ and immunoglobulins Ig A, Ig G, Ig M.

It was ascertained that a decrease of albumins and an increase of globulins, especially gamma-globulins, took place. Also, it was found an increase in immunoglobulins as compared to their normal values. These changes differ on the one hand according to the evolution of the disease and on the other hand to the age and sex.

The aging patiens show a greater increase of the gamma-globulins and immunoglobulins as compared to the adult patients and a greater decrease of albumins in aging patients as compared to adult ones.

BIBLIOGRAFIE

1. L. Buligescu, *Hepatitele cronice*, Edit. medicală, Bucureşti, 1976.
2. L. Schiff, *Bolile ficatului*, Edit. medicală, Bucureşti, 1966.
3. M. Saukali, O. Bao, E. Popper, Ann. Gastr. Hépat., **1**, 47 (1976).
4. O. Fodor şi colab., *Hepatita cronică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
5. L. Buligescu, Viaţa medicală, **13**, 1513—1522 (1966).
6. T. Nicolaescu, Viaţa medicală, **12**, 911—917 (1965).
7. T. Nicolaescu, *Hepatitele cronice*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1969.
8. I. Manta şi colab., *Metode biochimice în laboratorul clinic*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1976.
9. M. Balş şi colab., *Metode de laborator*, Edit. medicală, Bucureşti, vol. I şi II, 1977.
10. M. Cucuianu, *Biochimie clinică*, Edit. Dacia, Cluj-Napoca, 1977.
11. P. M. Casassa, F. Ghemi, Gl. Turco, Giorn. Geront., **10**, 1—35 (1962).
12. Kurt J. Isselbacher, Thomas J. Lamont, *Principles of internal medicine*, ed. a 8-a, Harrison, 1978, p. 1574.
13. A. Ince, Valentina Cîndea, A. Iliesa, Medicină internă, *2*, 16 (1979).
14. Kurt J. Isselbacher, Thomas J. Lamont, *Principles of internal medicine*, ed. a 8-a, Harrison, 1978, p. 1604.
15. S. Ritland, A. Bergan, Scand, J. Gastroent., **10**, 17 (1975).
16. G. David, Georgeta Enăchescu, *Fiziologia normală şi patologică*, Edit. Academiei, Bucureşti, 1968.

CURBA DE TRANZIŢIE VISCOZIMETRICĂ, INDICE AL MODIFICĂRILOR SUFERITE DE CROMATINĂ ÎN URMA TRATAMENTULUI CU CARCINOGENI

C. RABEGA, SIMONA BOTEA, MARIA RABEGA

Rezumat. Injectarea la şobolani normali a unor carcinogeni cu activitate specific (tioacetamida) sau nespecific hepatică (benz(a)pirenul) duce la modificări la nivelul cromatinei hepatice, manifestate prin alterarea formei curbe de tranziţie termică şi prin devierea de la normal a valorilor raportului DNA liber/DNA complexat. Se discută relaţiile DNA—proteine histonice—carcinogeni şi modul posibil în care aceştia din urmă acţionează la nivelul cromatinei.

Injectarea la şobolani normali a unor carcinogeni cu activitate specific (TAA) sau nespecific hepatică (BP) determină modificări la nivelul cromatinei hepatocitare, manifestate prin alterarea formei curbei de tranziţie viscozimetrică şi prin devierea de la normal a valorilor raportului DNA liber/DNA complexat (1).

Una dintre proprietăţile caracteristice ale moleculei de DNA este capacitatea sa de denaturare, adică de distrugere a structurii dublu catenare ca urmare a ruperii legăturilor de hidrogen intramoleculare. Tranziţia helix-ghem în cazul moleculei de DNA pur se poate vizualiza prin scăderea viscozităţii soluţiei de DNA paralel cu creşterea temperaturii; curba obţinută are un aspect unimodal.

Asocierea proteinelor histonice la molecula de DNA duce la modificarea curbei de tranziţie viscozimetrică, aceasta căpătînd un aspect bimodal (2), (3), (4).

În lucrarea de faţă s-a studiat modificarea curbelor de tranziţie viscozimetrică obţinute pentru cromatina extrasă din hepatocite de şobolani aflaţi sub tratament acut, în doză unică, cu substanţe carcinogene.

MATERIAL ŞI METODE

S-au folosit şobolani Wistar masculi, în greutate de 150—180 g, care au fost injectaţi i.p. cu o soluţie de tioacetamidă în ser fiziologic (150 mg/kg corp) sau i.m. cu o soluţie uleioasă de benz(a)piren (20 mg/kg corp). Animalele martor au primit injecţii administrate similar, dar cu ser fiziologic. Sacrificarea animalelor s-a făcut prin decapitare, la intervale de 1, 2, 12, 24 şi 48 de ore de la administrarea carcinogenilor sau a serului fiziologic.

Extracţia cromatinei s-a făcut după tehnica McConaughy & McCarthy (5) modificată. Modificările au constat în adăugarea ditionitului de sodiu la prima soluţie de spălare pentru reducerea activităţii proteazelor nucleare şi în extragerea proteinelor nehistonice prin tratament cu 0,3 M NaCl pe gheaţă, sub agitare 30 de minute. În final, cromatina extrasă s-a omogenizat la un omogenizator cu cuţite tip M.S.E. la turaţie maximă timp de 60 de secunde, iar fracţiunea solubilă a cromatinei s-a recoltat prin centrifugare la 12 000 rotaţii/min, 30 de minute.

St. cerc. biochim., 23, 2, 177—181 (1980)

Trasarea curbelor de tranziţie viscozimetrică s-a realizat pentru cromatina solubilizată în soluţie de 10^{-3} M NaCl cu ajutorul unui viscozimetru Ubbehlode termostatat. Probele de cromatină folosite pentru determinarea viscozităţii s-au diluat cu o soluţie de 10^{-3} M NaCl în apă deionizată, astfel încît la 260 nm prezentau o absorbţie de 0,3.

Trasarea curbei de tranziţie viscozimetrică s-a realizat pe baza modificărilor viscozităţii specifice a probelor de cromatină în funcţie de temperatură. Pornind de la 30° C, temperatura a fost crescută din 5 în 5 grade pînă la fierbere. Pentru estimarea ponderii de DNA liber şi DNA complexat s-au folosit derivatele de ordinul I ale funcţiilor date de curbele de tranziţie viscozimetrică, ştiut fiind faptul că prima fază a curbei reprezintă denaturarea segmentelor de DNA libere, iar faza a doua este dată de denaturarea DNA complexat cu histone (6).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Figura 1 prezintă aspectele curbelor de tranziţie viscozimetrică şi ale derivatelor de ordinul I ale funcţiilor date de aceste curbe pentru cromatina provenită din nucleii hepatocitari ai animalelor tratate acut,

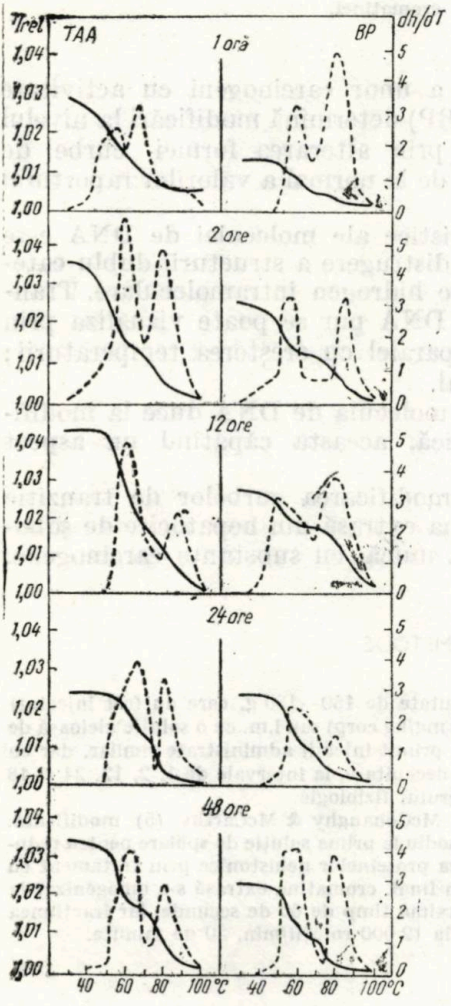


Fig. 1. — Aspectul curbelor de tranziţie viscozimetrică (———) şi al derivatelor de ordinul I ale funcţiilor date de acestea (— — — —) în cazul cromatinei provenite de la animale tratate acut, în doză unică, cu TAA şi BP pentru diferite intervale de timp.

în doză unică, cu tioacetamidă, carcinogen hepatic specific, și cu benz(a)-piren, carcinogen care nu determină la adult apariția de hepatoame.

O caracteristică a curbei de tranziție viscozimetrică a cromatinei o constituie raportul dintre cantitatea de DNA liber și cea aflată în complex cu proteinele histonice. În starea de heterocromatină cantitatea de DNA complexată fiind ceva mai mare (7), (8), raportul va căpăta valori subunitare, care se modifică pe măsură ce cantitatea de DNA complexat se micșorează în urma eucromatinizării.

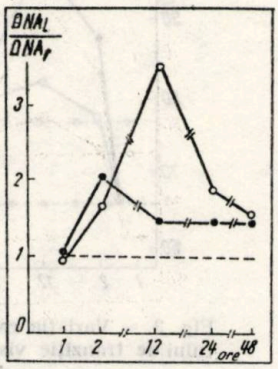


Fig. 2. — Variația ponderii DNA liber în cromatina tratată cu TAA (o—o) și BP (•—•) pentru diferite perioade de timp. — — — — = martor

În figura 2 este ilustrată modificarea ponderii DNA liber față de cea a DNA complexat în cromatina tratată cu carcinogeni și extrasă la diferite intervale de timp după administrarea acestora.

În cazul tratamentului cu TAA, cantitatea de DNA liber crește pînă la o valoare maximă ($DNA_l/DNA_c = 3,44$) atinsă la 12 ore de la administrarea carcinogenului, după care revine spre valorile înregistrate pentru cromatina normală ($DNA_l/DNA_c = 0,9$).

Tratamentul cu BP duce la modificarea raportului chiar în interval de o oră; după două ore de tratament sînt atinse valorile maxime ($DNA_l/DNA_c = 2,11$). De aici se instalează un platou, valorile oscilînd între 1,38 și 1,40.

În figura 3 este reprezentată în paralel variația Tm_2 (punctul de tranziție viscozimetrică a DNA complexat) și a cantității de DNA liber. În acest caz, în urma tratamentului cu TAA, cei doi parametri au un mers în același sens, adică se eliberează o cantitate din ce în ce mai mare de DNA și cresc valorile temperaturii de tranziție. Acest lucru pare paradoxal, deoarece cu cît asocierea dintre proteinele de înveliș și DNA este mai mică, cu atît este de așteptat ca valorile Tm_2 să fie mai scăzute. Acest comportament neașteptat ne face să credem că TAA acționează distructiv la nivelul DNA, indiferent de interacțiunea acestuia din urmă cu proteinele histonice. Probabil, modificările DNA în prezența TAA nu țin numai de acțiunea carcinogenului la nivelul acidului nucleic, ci și de o serie de alți factori.

Se știe că tratamentul cu TAA, chiar în doză unică, duce la modificări ale permeabilității membranei plasmatice și nucleare față de diferiți ioni (9). Pătrunderea în celulă și în nucleu a unei cantități de ioni mono- și/

sau bivalenţi, diferită faţă de cea din condiţii normale, duce la labilizarea cromatinei, adică la trecerea ei din starea de hetero- în cea de eucromatină. Este foarte probabilă nesuprapunerea zonelor în care TAA acţionează direct asupra DNA cu cele în care labilizarea apare ca urmare a modificărilor ionice ale microclimatului. Experimentele noastre fiind făcute *in*

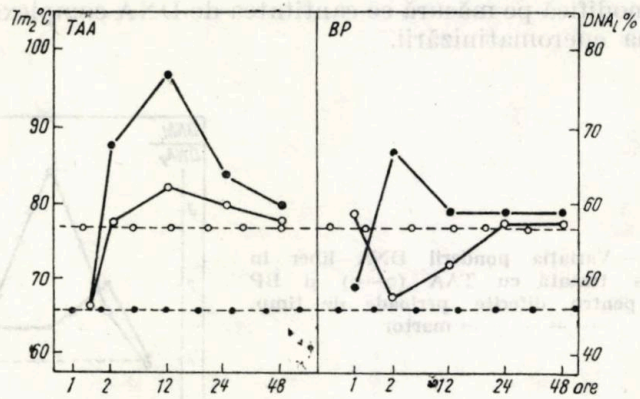


Fig. 3. — Variaţia cantităţii de DNA liber (● — ●) şi a punctului de tranziţie viscozimetrică Tm_2 (o — o) în cazul cromatinei tratate cu TAA şi BP.
— ● — — ● = DNA liber în cromatina normală
— o — — o = Tm_2 în cazul cromatinei normale

vivo, este foarte posibil ca alterările apărute la nivelul cromatinei şi evidenţiate în acest studiu prin modificarea tranziţiei viscozimetrice să nu fie datorate numai acţiunii directe a carcinogenului asupra cromatinei, ci să apară şi în urma schimbării compoziţiei mediului ionic intranuclear. Lucrări în curs de perfectare efectuate în laboratorul nostru vin să ateste această supoziţie.

În cazul tratamentului cu BP, la două ore de la administrarea noxei, odată cu creşterea cantităţii de DNA liber, se înregistrează şi o puternică scădere a punctului de tranziţie viscozimetrică. La intervale mai mari de timp apare o semnificativă scădere a cantităţii de DNA liber, însoţită de creşterea valorilor Tm_2. Aceste modificări în sens diferit ale celor doi parametri studiaţi sînt explicabile dacă ţinem seama de faptul că leziunile provocate de BP la nivelul DNA induc procese de reparare a acestuia din urmă. La locurile de sciziune catenară încep procese de reparare enzimatică, care refac pe porţiuni dublul helix (10), (11). Este foarte probabil ca această refacere să permită şi asocierea ulterioară a proteinelor de înveliş, fenomen care se reflectă prin creşterea stabilităţii termice şi prin scăderea cantităţii de DNA liber.

CONCLUZII

1. Modificările induse la nivelul cromatinei în urma tratamentului acut, în doză unică, cu carcinogeni specifici sau nespecifici se reflectă foarte bine în aspectul curbelor de tranziţie viscozimetrică.

2. În cazul tratamentului cu TAA, agentul oncogen acţionează direct asupra moleculei de DNA, producînd labilizarea, independent de interacţiunea DNA –proteine histonice.

3. Maximum de activitate în cazul TAA se obţine la 12 ore de la administrare, dar la 48 de ore se revine aproape de normal în privinţa valorilor viscozităţii cromatinei.

4. Efectele administrării BP sînt mai precoce, dar persistenţa lor în timp este mai mare decît în cazul TAA.

5. Refacerea stabilităţii termice a cromatinei aflate sub tratament cu BP se poate datora asocierii proteinelor histonice la zonele din dublul helix care au fost refăcute enzimatic.

Prezentat la redacţie
la 22 februarie 1980

Universitatea Bucureşti,
Facultatea de biologie
şi
Institutul „Dr. V. Babeş", Bucureşti

THERMAL TRANSITION CURVE — A DETECTION WAY OF THE CARCINOGEN-INDUCED ALTERATION AT THE CHROMATIN LEVEL

SUMMARY

Normal rats receiving a specific hepatic carcinogen (thioacetamide), or a non-specific one (benzopyrene), exhibit some alterations at the hepatocytic chromatin level, i.e. the modification of the thermal transition curve and of the free DNA/bound DNA ratio.

Discussions are carried out upon the DNA — histones — carcinogen relations and the possible way by which carcinogen works at the chromatin level.

BIBLIOGRAFIE

1. R. P. P. Fuchs, M. P. Daune, Biochemistry, **13**, 4435–4437 (1974).
2. D. E. Olins, S. L. Olins, P. H. Hippel, J. molec. Biol., **24**, 157–159 (1967).
3. R. Sapin, J. L. Demongeat, J. Charbon, Biochemie, **55**, 1401–1406 (1973).
4. R. K. Wilson, W. C. Starbuck, C. W. Taylor, J. Jordan, J. Busch, Cancer Res., **30**, 2942–2946 (1970).
5. B. L. McConaughy, B. J. McCarthy, Biochemistry, **11**, 998–1007 (1972).
6. H. J. Li, *Chromatin and chromosome structure*, sub red. H. J. Li, R. A. Eckhardt, Academic Press, New York – San Francisco – London, 1970, p. 37–69.
7. G. Russev, C. Venkov, R. Tsanev, Eur. J. Biochem., **43**, 253–256 (1974).
8. R. A. Webster, H. L. Moses, T. C. Spelsberg, Cancer Res., **36**, 2896–2904 (1976).
9. I. Moraru, C. T. Dragomir, E. Tomescu, C. Cotuţiu, D. Ungureanu, Path. Europ., **9**, 317–323 (1974).
10. B. W. Fox, Mutation Res., **23**, 129–133 (1974).
11. Th. W. Sneider, *Molecular biology of cancer*, sub red. J. Busch, cap. IV, Academic Press, New York – London, 1974, p. 107.

OBŢINEREA ŞI PROPRIETĂŢILE CATALITICE ALE INVERTAZEI IMOBILIZATE PE AGAROZĂ ACTIVATĂ CU BrCN

H. D. SCHELL, IRINA CORNOIU

Rezumat. Prin imobilizarea invertazei pe gel perlat de agaroză reticulată şi activată cu BrCN se obţine un preparat enzimatic insolubil cu un conţinut proteic de 0,9 mg/ml gel şi o activitate reziduală de 44 %. În urma imobilizării, invertaza nu îşi modifică pH-ul optim, temperatura optimă şi constanta Michaelis şi devine mai stabilă la diverşi factori inhibitori, ca temperaturi mai ridicate, valori de pH mai crescute şi sărurile metalelor grele ($HgCl_2$). Încărcată în coloană cromatografică, invertaza imobilizată permite hidroliza continuă a zaharozei cu un randament de 100 %.

Invertaza, denumită şi zaharază, β-fructofuranozidază sau β-D-fructofuranozid-fructohidrolază (EC 3.2.1.26), catalizează scindarea hidrolitică a zaharozei în fructoză şi glucoză, proces denumit şi invertirea zahărului. Această enzimă hidrolizează, pe lîngă zaharoză, şi unele trizaharide, ca rafinoza, genţianoza şi stahioza, nu însă şi polizaharide, ca inulina şi amidonul.

Invertaza se obţine, de regulă, din drojdia de bere şi se aplică mai ales la prepararea zahărului invertit, care, fiind mult mai solubil decît zaharoza şi necristalizînd decît foarte greu, este folosit de preferinţă la fabricarea lichiorurilor, a îngheţatei şi a multor altor produse zaharoase. Invertaza intră de asemenea şi în compoziţia miezului moale al bomboanelor îmbrăcate în ciocolată. Fasonarea şi glazurarea acestor bomboane se fac cu miezul lor încă consistent, care cu timpul se transformă într-o cremă moale datorită invertirii zahărului sub acţiunea invertazei conţinute în miez. Invertaza se foloseşte şi la fabricarea mierei artificiale, precum şi la dozarea cantitativă a zaharozei pe cale enzimatică.

Ne-am îndreptat atenţia asupra obţinerii unui preparat imobilizat catalitic activ al acestei enzime mai ales pentru faptul că prezintă reale perspective de aplicare practică în obţinerea zahărului invertit într-un sistem de funcţionare continuă. În acest sens, în lucrarea de faţă se prezintă modul de obţinere şi proprietăţile caracteristice ale unui preparat imobilizat al invertazei, realizat prin legarea ei covalentă de agaroză activată cu BrCN.

În literatura de specialitate sînt descrise deja cîteva preparate de invertază imobilizată, obţinute pe alte căi şi pe alte suporturi. Dintre acestea putem aminti: preparate de invertază imobilizată prin legare covalentă de colagen (1), (2) sau fibre de triacetat de celuloză (3), (4), prin copolimerizare cu acid metacrilic (5), dimetilacrilamidă şi alcool polivinilic (6), (7), prin adsorbţie pe DEAE-celuloză (8) sau chiar prin imobilizare pe particule magnetice de oxid de fier (9). Activităţile reziduale ale

preparatelor de invertază imobilizată rezultate variază în funcţie de agentul folosit şi sînt cuprinse în general între 18 şi 30%. Doar la preparatul obţinut prin adsorbţie pe DEAE-celuloză se constată o activitate mai mare (50%). Acest preparat prezintă însă dezavantajul că pierde relativ uşor enzima fixată, nefiind legată covalent de suport.

MATERIAL ŞI METODE

În cercetările noastre s-a folosit o invertază cristalină (Serva Heidelberg), iar ca suport insolubil un gel perlat de agaroză legată încrucişat, obţinută în laboratorul nostru (10) şi activată cu BrCN după metoda clasică (11). Pentru obţinerea preparatului enzimatic insolubil s-au tratat 15 ml gel proaspăt activat cu BrCN cu 200 mg invertază dizolvată în 10 ml soluţie $NaHCO_3$ 0,1 M ; amestecul de reacţie a fost lăsat peste noapte la temperatura camerei. A doua zi, conjugatul enzimatic rezultat a fost spălat alternativ cu apă distilată şi o soluţie de NaCl 0,5 M, pînă la îndepărtarea completă a enzimei nelegate. Determinarea cantitativă a enzimei legate de suport s-a făcut spectrofotometric, determinînd cantitatea de enzimă din amestecul de reacţie înainte şi după imobilizare.

Determinarea activităţii invertazei s-a făcut prin dozarea glucozei eliberate în urma acţiunii hidrolitice a enzimei asupra unei soluţii de zaharoză. Glucoza formată a fost determinată ţinînd seama de indicaţiile date de Noelting şi Bernfeld (12) şi procedînd după cum urmează : 1 ml soluţie zaharoză 1% se tratează cu 1 ml tampon acetat, pH 4,8, 0,2 M şi cu 1 ml soluţie de enzimă (0,05 mg/ml), lăsînd la incubat 15 min la temperatura de 55°C. După incubare se stopează reacţia prin adăugare de 0,5 ml reactiv dinitrosalicilic şi se fierb probele 5 min, după care se răcesc brusc şi se diluează cu 30 ml apă distilată. Cantitatea de glucoză eliberată se determină fotocolorimetric (Spekol, Carl Zeiss, Jena) la $\lambda = 490$ nm, folosindu-se un grafic de etalonare construit cu concentraţii de glucoză cuprinse între 1 şi 20 µmoli/ml. În cazul enzimei imobilizate, amestecul de reacţie a fost format din 0,25 ml gel enzimatic suspendat în 2 ml tampon acetat şi 1 ml soluţie de substrat.

Determinarea influenţei pH-ului asupra activităţii enzimatice s-a efectuat în condiţiile menţionate, lucrîndu-se însă la următoarele valori de pH : 2,7 ; 3,6 ; 4,8 ; 5,5 şi 6,5.

Determinarea influenţei temperaturii asupra activităţii enzimei libere şi imobilizate s-a făcut efectuîndu-se reacţia enzimatică la următoarele temperaturi : 35, 45, 55, 65, 75°C.

S-a determinat totodată şi termostabilitatea celor două preparate enzimatice, preincubîndu-le timp de 30 min la următoarele temperaturi : 35, 45, 55, 65, 75°C.

Determinarea influenţei concentraţiilor diferite de enzimă asupra procesului de hidroliză a zaharozei s-a efectuat folosindu-se în mediul de reacţie următoarele concentraţii de enzimă liberă : 0,0125, 0,0250, 0,0375 şi 0,050 mg şi următoarele concentraţii de enzimă legată : 0,25, 0,50, 0,75 şi 1 mg.

Determinarea influenţei concentraţiilor de substrat asupra activităţii enzimatice s-a făcut folosindu-se următoarele concentraţii de zaharoză : 0,025, 0,050, 0,075 şi 0,100 M.

Determinarea influenţei $HgCl_2$ asupra activităţii catalitice a enzimei libere şi legate s-a realizat folosindu-se în mediul de incubare cantităţi diferite ale acestui inhibitor, cuprinse între 1 şi 10 nmoli $HgCl_2$.

Pentru testarea comportării enzimei imobilizate la invertirea zaharozei într-un sistem continuu am folosit o coloană cu dimensiuni de $12 \times 0{,}8$ cm (8 ml gel enzimatic), trecînd în mod continuu o soluţie de zaharoză de 0,5% sau 1% cu o viteză de scurgere cuprinsă între 3 şi 40 ml/oră.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prin legarea covalentă a invertazei de agaroză reticulată şi activată cu BrCN se obţine un preparat enzimatic insolubil cu un conţinut proteic de 0,9 mg/ml gel şi o activitate reziduală de 44%. Menţionăm că activităţile reziduale indicate în literatura de specialitate pentru invertază imobilizată prin legare covalentă sînt cuprinse între 18 şi 30% (3), (6) şi numai în cazul preparatului obţinut prin adsorbţie pe DEAE-celuloză

de 50% (8). Valoarea activității reziduale a preparatului obținut de noi se apropie deci simțitor de valoarea maximă semnalată în literatura de specialitate. Preparatul enzimatic insolubil descris de noi prezintă totodată un avantaj prin faptul că a fost realizat prin legarea covalentă a enzimei de suportul insolubil, ceea ce nu mai permite o desprindere a

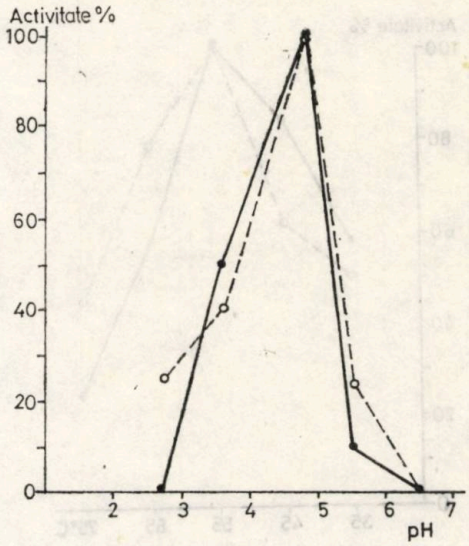


Fig. 1. — Variația activității invertazei libere (●———●) și imobilizate (o— — —o) în funcție de pH.

enzimei în timpul folosirii preparatului. Prin imobilizare, enzima nu își modifică pH-ul ei optim de acțiune, prezentînd, ca și enzima liberă, o activitate maximă la un pH de 4,8 (fig. 1).

Cu ocazia studierii influenței pH-ului asupra activității enzimei se constată totodată și o comportare destul de asemănătoare a celor două preparate de enzime, cu singura deosebire însă că enzima legată este ceva mai activă la pH-uri situate deasupra pH-ului optim. Astfel, în timp ce enzima imobilizată mai păstrează la un pH de 5,5 încă 25% din activitatea ei inițială, cea liberă păstrează la acest pH doar 10% din activitatea inițială.

Urmărind efectul temperaturii de reacție asupra activității enzimatice a celor două preparate de enzime (fig. 2), se observă că atît enzima liberă cît și enzima imobilizată au activități optime situate la temperatura de 55° C. Din figura 2 rezultă totodată că prin imobilizare enzima rămîne mai activă în comparație cu cea liberă la temperaturi mai ridicate. Astfel, la temperatura de 65° C enzima liberă își reduce activitatea la 58%, în timp ce enzima legată doar la 79%. Chiar la 75° C, enzima legată mai prezintă o activitate de 45%, în timp ce enzima liberă de numai 25%.

O creștere a rezistenței enzimei la acțiunea unor temperaturi mai ridicate s-a observat și la alte enzime imobilizate (13), (14).

La temperaturile situate sub cea optimă, valori mai mici observate la enzima imobilizată s-ar putea datora unor fenomene legate de difuzia mai lentă a substratului și a produsului de reacție prin structura tridimensională a suportului utilizat.

O comportare aproape identică se constată şi cu ocazia preincubării celor două forme de enzime, timp de 30 de min, la temperaturi cuprinse între 35 şi 75° C (fig. 3).

De data aceasta se constată însă o pierdere completă a activităţii catalitice a celor două forme de enzime după preincubarea lor la 75° C.

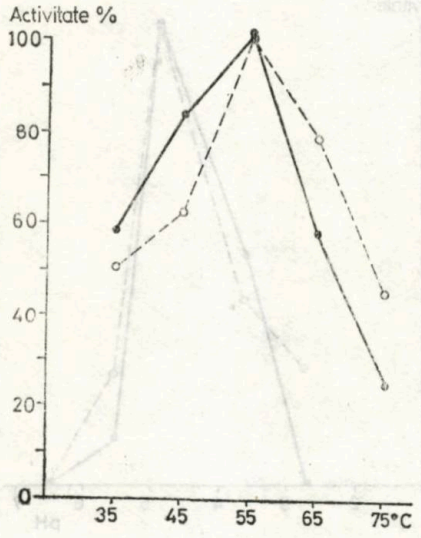


Fig. 2. — Variaţia activităţii invertazei libere (●———●) şi imobilizate (o— — —o) în funcţie de temperatura de reacţie.

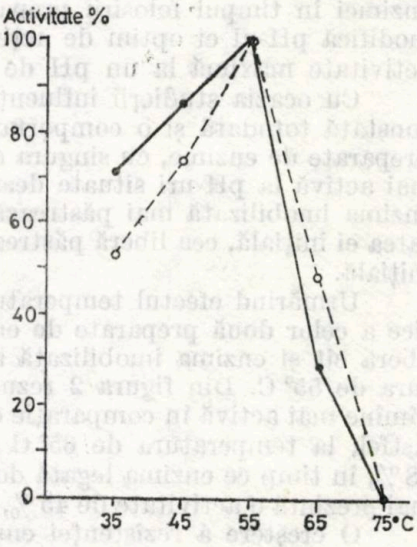


Fig. 3. — Influenţa temperaturii de preincubare (timp de 30 min) asupra activităţii invertazei libere (●———●) şi imobilizate (o— — —o).

În figura 4 se prezintă variaţia activităţii enzimatice în funcţie de cantitatea de enzimă folosită. Se observă la ambele forme de enzime o variaţie liniară a activităţii catalitice în funcţie de concentraţia de enzimă din mediul de reacţie.

Urmărindu-se influenţa concentraţiei de substrat asupra vitezelor de reacţie ale enzimei libere şi imobilizate (fig. 5) şi prezentîndu-se datele experimentale obţinute după metoda grafică a lui Lineweaver-Burk (15), se constată că ambele enzime prezintă aceeaşi afinitate pentru substrat, posedînd aceeaşi constantă Michaelis (143 mM). În urma imobilizării pe

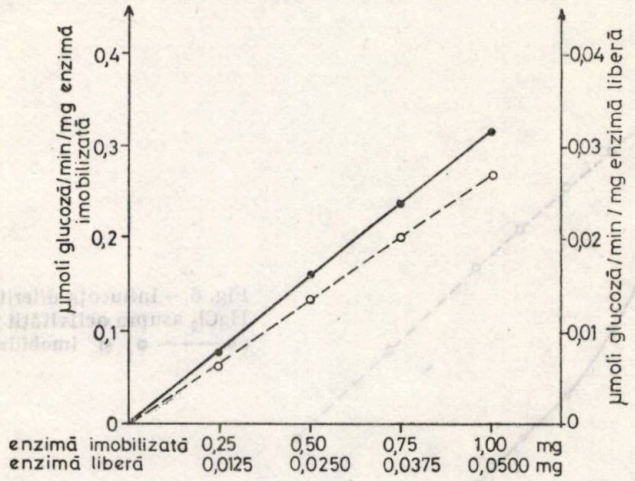


Fig. 4. — Variaţia activităţii enzimatice în funcţie de concentraţia invertazei libere (●———●) şi imobilizate (o— — —o).

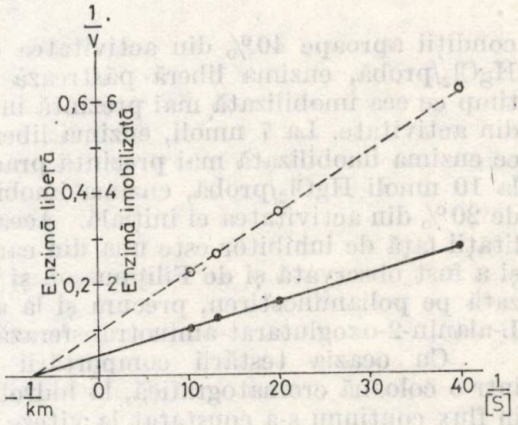


Fig. 5. — Determinarea grafică a constantei Michaelis după Lineweaver-Burk pentru invertaza liberă (●———●) şi imobilizată (o— — —o).

suportul insolubil, invertaza nu şi-a modificat Km. Acest fapt a fost observat şi de Weetall (16), care a folosit pentru imobilizare perle de sticlă poroasă. Alţi autori (2) însă au găsit în urma imobilizării invertazei, de exemplu pe colagen, o mică scădere a Km (160 mM la enzima liberă, faţă de 136 mM la enzima legată). Valoarea constantei Michaelis găsite de no se încadrează ca ordin de mărime în cele indicate în literatura de speciai tate (2), (6).

În figura 6 este prezentată influenţa unor concentraţii diferite ale unui inhibitor anorganic ($HgCl_2$) asupra activităţilor catalitice ale enzimei libere şi imobilizate. Se observă că, în urma imobilizării, invertaza devine considerabil mai rezistentă la acţiunea sării de mercur. Astfel, în timp ce la o concentraţie de 2 nmoli $HgCl_2$/probă enzima imobilizată îşi micşorează activitatea doar cu 8% faţă de cea iniţială, cea liberă pierde în aceste

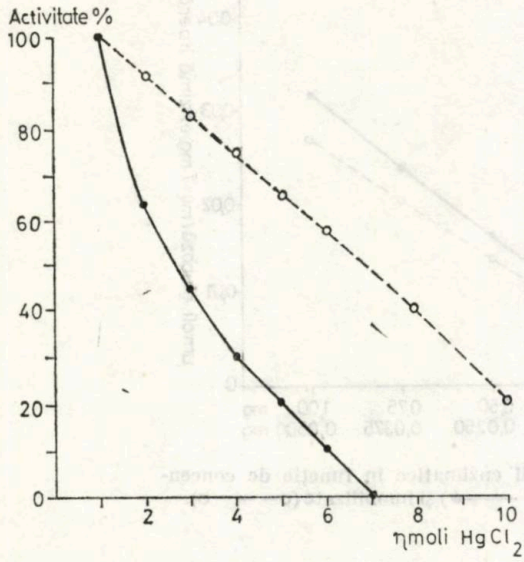


Fig. 6.— Influenţa diferitelor cantităţi de $HgCl_2$ asupra activităţii invertazei libere (●——●) şi imobilizate (o- - -o).

condiţii aproape 40% din activitatea ei. La o concentraţie de 6 nmoli $HgCl_2$/probă, enzima liberă păstrează doar 10% din activitatea ei, în timp ce cea imobilizată mai prezintă în aceste condiţii încă aproape 60% din activitate. La 7 nmoli, enzima liberă este complet inhibată, în timp ce enzima imobilizată mai prezintă practic 50% din activitatea ei. Chiar la 10 nmoli $HgCl_2$/probă, enzima imobilizată mai păstrează o activitate de 20% din activitatea ei iniţială. Această creştere considerabilă a stabilităţii faţă de inhibitor este una din caracteristicile enzimelor imobilizate şi a fost observată şi de Filippusson şi Hornby (17) la invertaza imobilizată pe poliaminostiren, precum şi la aspartat-aminotransferază (18), la L-alanin-2-oxoglutarat-aminotransferază (19) şi la multe altele.

Cu ocazia testării comportării invertazei imobilizate încărcate într-o coloană cromatografică, la hidroliza unei soluţii 0,5% de zaharoză în flux continuu s-a constatat la viteze de scurgere cuprinse între 3 şi 40 ml/oră o conversie de 100% a zaharozei în glucoză. Acest lucru a fost observat chiar după două săptămîni de funcţionare continuă a coloanei.

Mărind concentraţia zaharozei la 1%, se constată că invertirea zaharozei nu mai are loc în proporţie de 100% nici chiar la viteze mici de scurgere, fapt datorat, fără îndoială, prezenţei într-o cantitate mai mare a fructozei, care este un inhibitor cunoscut al invertazei.

Comportarea invertazei imobilizate la conversia în flux continuu a zaharozei deschide perspectivele folosirii ei în practică. Invertaza imobi-

lizată s-a dovedit a fi totodată şi foarte stabilă în timp în comparaţie cu cea liberă, prezentînd practic nemodificată activitatea ei şi după 3 luni de păstrare la 3—4° C, suspendată în apă distilată.

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a invertazei de agaroză activată cu BrCN se obţine un preparat enzimatic insolubil cu un conţinut proteic de 0,9 mg/ml gel şi o activitate reziduală de 44%.
2. Prin imobilizare, invertaza nu îşi modifică pH-ul şi temperatura ei optimă de acţiune, în comparaţie cu enzima liberă, devenind totodată mai stabilă faţă de acţiunea unor temperaturi mai ridicate.
3. Prin imobilizare, invertaza nu îşi modifică afinitatea pentru substrat, prezentînd acelaşi Km ca şi cea liberă.
4. Prin imobilizare, enzima devine considerabil mai rezistentă faţă de acţiunea inhibitoare a $HgCl_2$.
5. Încărcată în coloană cromatografică, invertaza imobilizată permite hidroliza zaharozei în flux continuu şi nu prezintă scăderea activităţii ei hidrolitice nici după două săptămîni de funcţionare continuă.

Mulţumim tehn. Elena Iaport pentru asistenţa tehnică acordată.

Prezentat la redacţie
la 4 martie 1980

Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti

HERSTELLUNG UND KATALYTISCHE EIGENSCHAFTEN DER AN BrCN-AKTIVIERTE AGAROSE GEBUNDENEN INVERTASE

ZUSAMMENFASSUNG

Durch kovalente Bindung der Invertase an perlförmiges Gel BrCN-aktivierter vernetzter Agarose wurde ein unlösliches Enzympräparat mit einem Proteingehalt von 0,9 mg/ml Enzymgel und einer Restaktivität von 44% erhalten. Die trägerfixierte Invertase weist das gleiche pH- und Temperaturoptimum sowie dieselbe Michaelis-Konstante, wie das ungebundene Enzym auf und ist denaturierenden Einflüssen, wie erhöte Temperaturen und pH-Werte sowie Schwermetallen gegenüber beständiger. In eine Enzymsäule eingetragen, erlaubt sie eine kontinuierliche 100%-ige Invertierung der Saccharose.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Venkathasubramanian, W. R. Vieth, Biotechnol. Bioeng., **15**, 583 (1973).
2. W. R. Vieth, K. Venkathasubramanian, *Collagen-immobilized enzyme systems*, în *Methods in enzymology*, sub red. K. Mosbach, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, vol. 44, p. 260.
3. D. Dinelli, W. Marconi, F. Morisi, *Fiber-entrapped enzymes*, în *Methods in enzymology*, sub red. K. Mosbach, Academic Press, New York—San Francisco—London, 1976, vol. 44, p. 227.

4. W. Marconi, S. Gulinelli, F. Morisi, Biotechnol. Bioeng., **16**, 501 (1974).
5. G. Manecke, S. Singer, Makromol. Chem., **39**, 13 (1960).
6. H. Suzuki, H. Maeda, A. Yamanchi, în *Immobilized enzyme technology-research and applications*, sub red. H. H. Weetall şi H. Suzuki, Plenum Press, New York—London, 1975, p. 185.
7. H. Maeda, H. Suzuki, A. Yamanchi, Biotechnol. Bioeng., **15**, 607 (1973).
8. H. Suzuki, Y. Ozawa, H. Maeda, Agr. Biol. Chem., **30**, 807 (1966).
9. G. Gellf, J. Bouchrant, Biochem. Biophys. Acta, **334**, 467 (1974).
10. H. D. Schell, T. Benţia, M. A. Mateescu, Brevet românesc nr. 65382/1977.
11. R. Axén, J. Porath, S. Ernback, Nature, **214**, 1302 (1967).
12. G. Noelting, P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta, **31**, 286 (1948).
13. H. D. Schell, D. Popov, Rev. roum. Biochim., **14**, 289 (1977).
14. H. D. Schell, D. Bănăţeanu, T. Benţia, Rev. roum. Biochim., **17**, 137 (1980).
15. H. Lineweaver, D. Burk, J. Amer. Chem. Soc., **56**, 658 (1934).
16. H. H. Weetall, Chemiker-Zeitung, **97**, 611 (1973).
17. H. Filippusson, W. H. Hornby, Biochem. J., **120**, 215 (1970).
18. H. D. Schell, O. Gozia, I. Cornoiu, M. A. Mateescu, T. Benţia, Rev. roum. Biochim., **14**, 295 (1977).
19. O. Gozia, H. D. Schell, Rev. roum. Biochim., **16**, 273 (1979).

TAXONI CHIMICI INFRASPECIFICI DE *CHRYSANTHEMUM BALSAMITA* L. *(ASTERACEAE)*

M. TĂMAŞ, EM. FĂGĂRĂŞANU, L. POP

Rezumat. Sînt descrişi doi taxoni chimici infraspecifici de *Chrysanthemum balsamita*, pe baza componenţilor principali din uleiul volatil. Aceşti taxoni corespund celor două varietăţi morfologice. Pentru *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides* se propune denumirea de *Ch. balsamita* L. chemovar. *carvone*, iar pentru *Ch. balsamita* L. var. *balsamita* se propune denumirea de *Ch. balsamita* L. chemovar. *camphor*. Determinarea componenţilor principali din uleiul volatil a fost efectuată prin CSS şi CG.

Chrysanthemum balsamita L. (fam. *Asteraceae)*, calapărul, este o specie de origine sud-asiatică, introdusă în cultură şi în Europa, la noi în ţară fiind întîlnită ca specie aromatică şi medicinală, ca plantă cultivată prin grădini în toate regiunile ţării (1).

Studiată în legătură cu valoarea sa terapeutică, cei mai mulţi autori au semnalat prezenţa, în frunzele şi în inflorescenţele speciei, a uleiului volatil (2).

Sînt recunoscute două varietăţi morfologice : *Ch. balsamita* L. var. *balsamita*, cu flori radiare albe, şi *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides*, fără flori radiare albe (1), (3).

Dacă în privinţa conţinutului în ulei volatil rezultatele din literatură sînt concordante, în privinţa compoziţiei chimice a acestuia rezultatele sînt contradictorii.

Voigts, Rogers şi Fischer (1938, citaţi după (2)) au identificat carvona drept component principal al uleiului volatil. Göckeritz (3), precizînd că a utilizat *Ch. balsamita* L. var. *balsamita*, determină în uleiul volatil 72—83% 1-camfor. Zielinska-Sowicka şi Wolbis (4), fără a indica varietatea pe care au lucrat, determină în uleiul volatil de *Ch. balsamita* 91% camfor prin CG şi 65,8—70,5% prin metoda fotometrică. Radu, Tămaş şi colab. (5), lucrînd pe *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides*, determină 1-carvona drept component principal al uleiului volatil, prin CG şi CSS.

Date fiind prezenţa celor două varietăţi morfologice, neconcordanţa în privinţa componentului principal din uleiul volatil şi faptul că pînă în prezent nu s-a efectuat un studiu comparativ al uleiurilor volatile obţinute de la cele două varietăţi, ne-am propus un studiu chimic calitativ al uleiurilor volatile la cele două varietăţi de *Ch. balsamita*.

St. cerc. biochim., 23, 2, 191—193 (1980)

MATERIAL ŞI METODE

Am utilizat frunze provenite de la cele două varietăţi de *Ch. balsamita*: *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides* şi *Ch. balsamita* L. var. *balsamita*, cultivate în Grădina botanică a Universităţii „Babeş-Bolyai" din Cluj-Napoca. Frunzele au fost recoltate în luna iunie, apoi uscate.

Uleiul volatil a fost extras prin antrenare cu vapori de apă, după tehnica indicată în FR IX(6). Uleiul volatil obţinut a fost deshidratat pe sulfat de sodiu sicativ. Cel obţinut de la *Ch. balsamita* var. *balsamita* se prezintă sub consistenţă untoasă şi a fost dizolvat în benzen.

Pentru analiza calitativă a uleiului volatil am utilizat tehnica CSS de silicagel G(Merck), sistemul de solvenţi format din toluen-acetat de etil (4 : 1) (7), iar ca reactivi de identificare am folosit vanilină-acid sulfuric concentrat, vapori de iod şi 2,4-dinitrofenilhidrazină (8). Ca substanţe de referinţă am utilizat carvona şi camfor, dizolvate în concentraţie de 1% benzen.

Cromatografia în fază gazoasă a fost efectuată la un aparat GCHF, cu detector FID, în următoarele condiţii experimentale:

- adsorbant 5% FFAP pe chromosorb W(HP) 100/120 mesh
- două coloane de 2 m lungime şi cu diametrul interior de 2 mm
- temperatura coloanei 5′—15′—15′ de la 80 la 200°C
- temperatura injector = 210°C, temperatura detector = 220°C, gaz purtător: azot 30 cm^3/min, H_2 40 cm^3/min
- viteza de înregistrare: 200 mm/oră
- proba injectată 0,5 µl

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analiza cromatogramei obţinute pe strat subţire a relevat opt componente în uleiul volatil de *Ch. balsamita* var. *balsamita* şi zece componente în uleiul volatil de *Ch. balsamita* var. *tanacetoides*, cinci dintre componente fiind comune.

Carvona (Rf = 0,78) este prezentă drept component principal numai în uleiul volatil de *Ch. balsamita* var. *tanacetoides*, pe cînd în uleiul volatil de *Ch. balsamita* var. *balsamita* componentul principal este reprezentat de camfor (Rf = 0,82), care lipseşte în prima varietate.

O separare şi mai bună a componentelor s-a realizat prin cromatografia în fază gazoasă (fig. 1), prin care s-au pus în evidenţă 25 de compo-

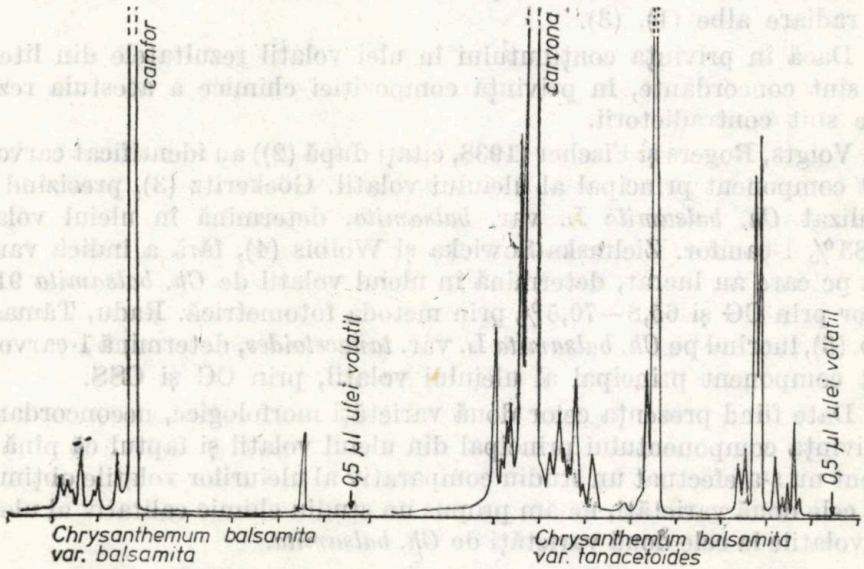


Fig. 1. — Cromatograma în fază gazoasă a uleiurilor volatile de *Chrysanthemum balsamita* L. var. *balsamita* şi *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides*.

nente în uleiul volatil de *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* şi nouă componente în cel de *Ch. balsamita* var. *balsamita*. Identificarea carvonei şi a camforului s-a făcut prin măsurarea timpului de retenţie, comparativ cu cel al substanţelor etalon, precum şi prin proba amestecului. Se confirmă şi pe această cale deosebirea în privinţa componentului principal din uleiul volatil al celor două varietăţi. Astfel, *Ch. balsamita* var. *tanacetoides* are component principal carvona, iar *Ch. balsamita* var. *balsamita* are component principal al uleiului volatil camforul.

Bazaţi pe aceste date, propunem ca cele două varietăţi să se denumească astfel: *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides* — *Ch. balsamita* L. chemovar. *carvone* şi *Ch. balsamita* L. var. *balsamita* — *Ch. balsamita* L. chemovar. *camphor*, conform indicaţiilor de nomenclatură chimică infraspecifică (9).

Prezentat la redacţie
la 3 decembrie 1979

Facultatea de farmacie,
I.M.F. Cluj-Napoca

INFRASPECIFIC CHEMICAL TAXA OF *CHRYSANTHEMUM BALSAMITA* L. *(ASTERACEAE)*

SUMMARY

Two infraspecific chemical taxa of *Chrysanthemum balsamita* L. are described, based on the main components of essential oil. These taxa correspond to the two morphological varieties.

For *Ch. balsamita* L. var. *tanacetoides* the name of *Ch. balsamita* L. chemovar. *carvone* has been suggested, while for *Ch. balsamita* L. var. *balsamita* that of *Ch. balsamita* L. chemovar. *camphor*.

The determination of the main components was achieved by means of TLC and GC.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Flora Republicii Populare Române*, vol. IX, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1964, p. 421.
2. E. Gildemeister, Fr. Hoffmann, *Die ätherischen Öle*, Bd. VI, Akademie-Verlag, Berlin, 1961, p. 674.
3. D. Göckeritz, Pharmazie, **23**, 515 (1968).
4. Regina Zielinska-Sowicka, Maria Wolbis, Herba Pol., **16**, 286 (1970).
5. A. Radu, M. Tămaş, R. Ciupe, Felicia Popa-Tămaş, Clujul med., **45**, 828 (1972).
6. * * * *Farmacopeea română*, ed. a IX-a, Edit. medicală, Bucureşti, 1976, p. 820.
7. H. Popescu, Veturia Pop, Clara Opferman, Rev. Chim., **25**, 160 (1974).
8. * * * *Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography*, *E. Merck*, Darmstadt, 1974.
9. P. Tetenyi, *Infraspecific chemical taxa of medicinal plants*, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1970.

DISTRIBUŢIA INTRACELULARĂ ŞI FORMELE MOLECULARE MULTIPLE ALE DN-AZELOR ÎN TIMPUL DEZVOLTĂRII FUNGULUI *ASPERGILLUS NIGER*

S. VASU, S. A. HULEA, MAGDALENA LUNGU

Rezumat. S-a studiat activitatea DN-azică de pe diferite formaţiuni subcelulare izolate din miceliul tînăr şi bătrîn de *A. niger* crescut în culturi de suprafaţă şi agitate. Activitatea enzimei în miceliul tînăr a avut un pH optim în jur de 8,5, în timp ce în miceliul bătrîn a apărut şi un maxim de activitate în jurul pH-ului 5,5. Activitatea DN-azică în cultura de suprafaţă a fost mai mare decît în cultura agitată. Evidenţierea activităţii DN-azice după electroforeza în gel de poliacrilamidă a arătat o pronunţată heterogenitate a enzimei, indicînd existenţa unor forme moleculare multiple ale DN-azei din *A. niger*.

Într-un studiu asupra nucleazelor din *Aspergillus niger* crescut pe mediu solid, Nagasaki (1) a arătat că în miceliul tînăr activitatea DN-azică şi RN-azică la pH slab alcalin sau neutru este cu mult mai mare decît a celor cu pH optim în jur de 4,5. Pe măsură ce miceliul îmbătrîneşte, activitatea nucleazică la pH acid devine mai mare decît cea la pH slab alcalin. În timpul creşterii şi al dezvoltării fungului *A. niger*, au loc modificări importante, cantitative şi calitative, ale activităţii RN-azice la nivelul diferitelor formaţiuni subcelulare, aşa cum am arătat într-o lucrare anterioară (2).

Extinzînd aceste cercetări ale DN-azelor din fungul *A. niger*, ne-am propus în prezenta lucrare să urmărim distribuţia activităţii DN-azice intracelulare în culturi tinere şi bătrîne de *A. niger*, fungul fiind crescut în culturi de suprafaţă şi agitate. Totodată ne-am preocupat de studiul formelor moleculare multiple ale DN-azei la nivelul formaţiunilor subcelulare cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă. Rezultatele au pus în evidenţă modificări importante de ordin cantitativ şi calitativ între cele două vîrste şi tipuri de culturi. Detectarea activităţii DN-azice după electroforeza în gel de poliacrilamidă a arătat că DN-azele din *A. niger* prezintă o heterogenitate pronunţată, fapt care nu a fost pînă acum menţionat în literatură nici pentru *A. niger* şi nici pentru alţi fungi din genul *Aspergillus*.

MATERIAL ŞI METODE

Fungul folosit în acest studiu a fost *A. niger* ICA-34 din colecţia ICICA-Bucureşti. Acrilamida, bis-acrilamida, N, N, N′, N′-tetrametiletilendiamîna, DNA înalt polimerizat din timus de viţel au fost obţinute de la firma Koch-Light, restul reactivilor fiind procuraţi de la Întreprinderea „Reactivul" din Bucureşti.

St. cerc. biochim., 23, 2, 195—200 (1980)

Cultivarea fungului *A. niger* s-a realizat pe mediul lichid Raulin în vase Erlenmeyer de 750 ml în culturi de suprafaţă şi agitate. Agitarea culturilor s-a făcut pe un agitator rotativ cu 120 rotaţii/min, iar temperatura de cultivare a fost de 28°C. După perioada de cultivare, miceliul era separat de lichidul de cultură şi omogenizat într-o soluţie de zaharoză 0,25 M în proporţie de 1 : 2(g/v) cu ajutorul unui omogenizator cu cuţite la o turaţie de 4000 rotaţii/min, timp de 30 de secunde. Această operaţie s-a repetat de două ori.

Izolarea formaţiunilor subcelulare s-a făcut prin centrifugare diferenţială, după cum s-a arătat anterior (2). După centrifugare, formaţiunile subcelulare au fost suspendate în apă distilată şi îngheţate la — 15° C. După un ciclu de două îngheţări—dezgheţări, s-a determinat activitatea DN-azică.

Determinarea activităţii DN-azice s-a făcut prin măsurarea absorbţiei la 260 nm a produşilor alcool-solubili rezultaţi în urma acţiunii enzimei asupra DNA cu grad înalt de polimerizare, urmînd în general metoda lui Kato şi Ikeda (3). Amestecul de reacţie conţinea : 0,3 ml tampon (tampon acid citric 0,1 M — fosfat de sodiu 0,2 M pentru pH 3—7 şi tampon Tris-HCl 0,2 M pentru pH 7—9,5), 0,1 ml $MgSO_4$ 0,05 M, 0,1 ml soluţie enzimatică şi 0,5 ml DNA 0,08%. După o perioadă de incubare de 2 ore la 37°C, reacţia era oprită cu 3 ml alcool etilic 35%, $MgSO_4$ 0,05 M răcit în gheaţă. Amestecul era ţinut 20 min la + 4°C, după care era centrifugat la 4000 rotaţii/min timp de 20 min. Din supernatantul clar se lua 1 ml, care era diluat la 5 ml cu apă distilată, şi absorbţia era măsurată la 260 nm. Creşterea absorbţiei la 260 nm cu 0,1 în timp de 1 oră a fost definită ca o unitate DN-azică.

Evidenţierea formelor moleculare multiple ale DN-azei s-a realizat urmînd, cu mici modificări, tehnica folosită de Vasu şi colab. (2) pentru detectarea activităţii RN-azice după electroforeza în gel de poliacrilamidă. Concentraţia gelului de poliacrilamidă era de 7,5%, iar tamponul de electroforeză era 0,095 M glicină — 0,012 M Tris pH 8,4. S-a lucrat în sistem continuu de tampon (aceeaşi concentraţie de tampon în gel şi în cuve), iar DNA înalt polimerizat a fost inclus în gel la o concentraţie de 0,01%. După terminarea electroforezei, gelul a fost imersat timp de 30 min în 0,025 M Tris-HCl pH 7,8, 0,01 M $MgSO_4$. După incubare în cameră umedă la 37°C, gelul a fost imersat timp de 60 min în alcool etilic-acid acetic-H_2O (30 : 5 : 65 v/v), după care a fost colorat cu albastru de toluidină 0,2% în acid acetic 1% timp de 20 min. Zonele cu activitate DN-azică au apărut ca pete incolore după spălări repetate cu apă.

Electroforeza în sistem discontinuu de tampon s-a realizat în gel de poliacrilamidă 7,5% în tuburi de sticlă (10×0,5 cm), urmîndu-se în general tehnica lui Laemmli (4), excepţînd folosirea dodecilsulfatului de sodiu şi a gelului de 3% acrilamidă. Detecţia activităţii DN-azei se făcea ca în cazul electroforezei în sistem continuu.

Timpul de electroforeză a fost de 4 ore la un curent de 3 mA/gel.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela 1 sînt prezentate activităţile DN-azice ale formaţiunilor subcelulare izolate din miceliul de diferite vîrste. Examinînd datele tabelei, se remarcă dintr-un început că activitatea DN-azică este cu mult mai mare în culturile de suprafaţă decît în cele agitate. Atît în omogenatul de miceliu, cît şi pe diferitele formaţiuni subcelulare izolate din culturile de suprafaţă, DN-aza cu pH optim la 8,0—9,0 este mult mai activă în miceliul tînăr decît în cel bătrîn. O situaţie similară se întîlneşte la culturile agitate. Se pare deci că patternul DN-azei în cursul creşterii fungului este asemănător celui al RN-azei. Este interesant de remarcat faptul că în culturile de suprafaţă activitatea enzimatică a putut fi măsurată la ambele pH-uri optime ale DN-azei la miceliul de 3 şi 7 zile. În culturile agitate însă, la nuclei şi la microzomi activitatea DN-azică la pH 5,4 nu a putut fi determinată, fiind sub limita de detecţie a metodei.

Variaţia activităţii DN-azice a diferitelor formaţiuni subcelulare în funcţie de pH este arătată în figurile 1 şi 2. La culturile de 3 zile, atît de suprafaţă cît şi agitate, există un singur maxim de activitate DN-azică, şi anume la pH 8,0—8,5 (fig. 1).

Tabela 1

Activitatea DN-azică a diferitelor formațiuni subcelulare izolate din miceliul de *Aspergillus niger*

Fracțiunea subcelulară	3 zile				7 zile			
	cultura de suprafață		cultura agitată		cultura de suprafață		cultura agitată	
	pH : 5,4	8,5	5,4	8,5	5,4	8,5	5,4	8,5
Omogenat de miceliu	8,1	27,6	0,8	6,3	1,05	0,71	0,4	0,36
Fracțiunea nucleară	0,02	30,0	* —	18,0	0,40	0,52	* —	0,60
Fracțiunea mitocondrială	0,25	1,60	0,45	7,70	0,53	1,19	0,61	0,92
Fracțiunea microzomală	0,77	5,80	* —	1,04	1,38	3,65	* —	1,05
Citosol	3,72	35,0	3,60	7,10	4,0	1,23	2,15	1,32

Notă. Activitatea enzimatică a fost exprimată în unități DN-azice per ml, raportate la densitatea optică măsurată la 280 nm pentru fiecare formațiune subcelulară.

* În aceste cazuri, activitatea enzimatică nu a putut fi măsurată, fiind sub limita de sensibilitate a metodei folosite de noi.

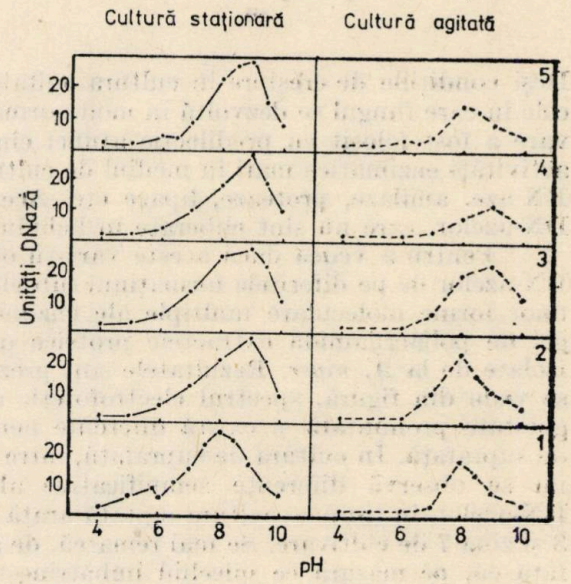


Fig. 1.— Variația activității DN-azice a diferitelor formațiuni subcelulare în funcție de pH la o cultură de 3 zile :
1, omogenat de miceliu ; *2*, fracțiunea nucleară ; *3*, fracțiunea mitocondrială ; *4*, fracțiunea microzomală ; *5*, citosol.

Pe măsură ce miceliul îmbătrînește și procesele de catabolism devin predominante, apare și un maxim de activitate în zona de pH 5,6. Este interesant de observat că nucleii și microzomii izolați de la culturile agitate de 7 zile nu arată existența unei DN-aze acide, cele două maxime de acti-

vitate fiind la pH 7,5 şi 9,0 (fig. 2). Depozitul mitocondrial de la aceleaşi culturi prezintă trei maxime, şi anume la pH 4,5, 6 şi în zona de pH 8 —9. Este posibil ca diferenţele observate în curbele de pH ale DN-azei de pe formaţiunile subcelulare izolate de la *A. niger*, crescut în cele două variante (de suprafaţă şi agitat), să se datoreze condiţiilor diferite de cultivare.

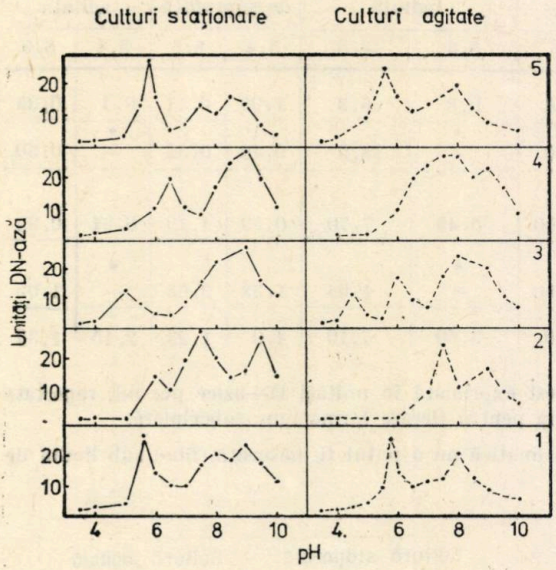


Fig. 2.— Variaţia activităţii DN-azice a diferitelor formaţiuni subcelulare în funcţie de pH la o cultură de 7 zile :
1, omogenat de miceliu; *2*, fracţiunea nucleară; *3*, fracţiunea mitocondrială; *4*, fracţiunea microzomală; *5*, citosol.

Deşi condiţiile de creştere în cultura agitată se deosebesc foarte mult de cele în care fungul se dezvoltă în mod normal în natură, acest fel de cultivare a fost folosit cu predilecţie atunci cînd s-a urmărit obţinerea unor activităţi enzimatice mari în mediul de cultură, aşa cum este cazul pentru RN-aze, amilaze, proteaze, lipaze etc. Aceste condiţii nu se aplică însă DN-azelor, care nu sînt eliberate în lichidul de cultură la *A. niger*.

Pentru a vedea dacă aceste variaţii observate la curbele de pH ale DN-azelor de pe diferitele formaţiuni subcelulare nu se datoresc existenţei unor forme moleculare multiple ale enzimei, am supus electroforezei în gel de poliacrilamidă extractele proteice de pe formaţiunile subcelulare izolate de la *A. niger*. Rezultatele sînt prezentate în figura 3. După cum se vede din figură, spectrul electroforetic al DN-azei prezintă o heterogenitate pronunţată şi există diferenţe nete între cultura agitată şi cea de suprafaţă. În cultura de suprafaţă, între cele două vîrste ale miceliului nu se observă diferenţe semnificative ale spectrului electroforetic al DN-azelor, în timp ce cultura agitată arată diferenţe marcante între ziua 3 şi ziua 7 de cultivare. Se mai remarcă, de asemenea, la cultura de suprafaţă că, pe măsură ce miceliul îmbătrîneşte, creşte activitatea pe gel a fracţiunilor DN-azice cu mobilitate electroforetică mică şi a celor cu mobilitate mare, însă numărul de benzi cu activitate DN-azică se modifică foarte puţin sau deloc. În ceea ce priveşte diferenţele înregistrate între cele două tipuri de culturi, ele s-ar putea datora condiţiilor diferite în care s-a făcut cultivarea fungului.

Referitor la detecția activității DN-azice după electroforeză în gel, trebuie să remarcăm că tehnica disc-electroforezei a dat rezultate net superioare celei în sistem continuu de tampon, efectuată în sistem orizontal. Electroforeza în gel de poliacrilamidă în sistem continuu a DN-azelor de pe diferitele formațiuni subcelulare, folosind tehnica descrisă pentru electroforeza RN-azelor (2), a arătat că, în contrast cu situația întîlnită în cazul RN-azelor, se obține o slabă separare electroforetică, fapt care nu permite identificarea tuturor fracțiunilor cu activitate DN-azică (rezultate nepublicate). Zona mai mare de activitate DN-azică din partea superioară a gelului (fig. 3) se datorește unei DN-aze cu mobilitate electroforetică foarte mică și a cărei migrare este întîrziată datorită formării probabil a unui complex enzimă —substrat. Acest fenomen a fost observat de Boyd și Mitchell (5) lucrînd cu preparate purificate de DN-ază pancreatică. Este interesant de remarcat că această situație se întîlnește în mod deosebit în cazul electroforezei extractelor brute preparate din miceliul de *A. niger*. Pe măsură ce gradul de puritate a enzimei crește, se observă benzi bine delimitate, avînd loc și micșorarea corespunzătoare a benzii de la partea superioară a gelului (rezultate nepublicate).

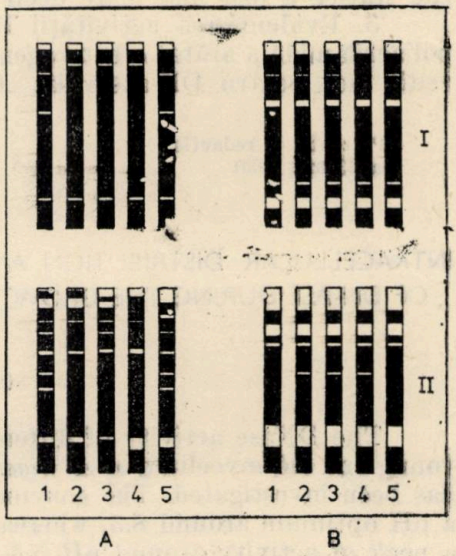


Fig. 3. — Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă a DN-azelor de pe formațiunile subcelulare ale fungului *Aspergillus niger* la 3 și 7 zile în cultură agitată și de suprafață : I, cultură de 3 zile; II, cultură de 7 zile; *A*, cultură agitată; *B*, cultură de suprafață; *1*, omogenat de miceliu; *2*, fracțiunea nucleară; *3*, fracțiunea mitocondrială; *4*, fracțiunea microzomală; *5*, citosol.

Detecția activității DN-azice în urma electroforezei în gel de poliacrilamidă ne-a demonstrat heterogenitatea electroforetică pronunțată a DN-azelor din *A. niger*, fapt nedemonstrat pînă în prezent nici pentru *A. niger* și nici pentru alți fungi din genul *Aspergillus*. Într-adevăr, cercetări recente, întreprinse în laboratorul nostru, au arătat că spectrul electroforetic al DN-azelor din extractele brute de *A. oryzae* și *A. terricola* prezintă o heterogenitate electroforetică pronunțată (date nepublicate). Ar fi interesant ca prin cercetări viitoare să se vadă dacă unele din fracțiunile cu activitate DN-azică detectate pe gel reprezintă enzime cu proprietăți fizico-chimice distincte sau sînt forme moleculare multiple ale uneia și aceleiași enzime.

CONCLUZII

1. Activitatea DN-azică de pe formaţiunile subcelulare izolate de la miceliul tînăr arată un maxim în zona de pH 8—9, în timp ce la miceliul bătrîn apare şi un maxim în zona de pH 5—6.

2. În condiţiile noastre de cultivare, activitatea DN-azică în culturile statice a fost mai mare decît în culturile agitate.

3. Evidenţierea activităţii DN-azice după electroforeză în gel de poliacrilamidă a arătat o heterogenitate pronunţată a DN-azei, fapt nedovedit încă pentru DN-azele din *A. niger*.

Prezentat la redacţie
la 23 mai 1980

Institutul de ştiinţe biologice, Bucureşti

INTRACELLULAR DISTRIBUTION AND THE MULTIPLE MOLECULAR FORMS OF DN-ASE DURING THE GROWTH OF THE FUNGUS *ASPERGILLUS NIGER*

SUMMARY

The DNase activity of different subcellular fractions, isolated from young and old mycelium of *A. niger* grown in surface and shaken cultures, has been investigated. The enzyme activity in the young mycelium had a pH optimum around 8.5, whereas in the old mycelium there was also a peak of activity around pH 5.5. The surface culture showed a higher DNase activity than the shaken culture. The detection of DNase activity after polyacrylamide gel electrophoresis showed a marked electrophoretic heterogeneity of the enzyme indicating the existence of multiple molecular forms of the *A. niger* DNase.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Nagasaki, J. gen. appl. Microbiol., **12**, 267 (1966).
2. S. Vasu, S. A. Hulea, S. Rădulescu, Rev. roum. Biochim., **8**, 351 (1971).
3. M. Kato, Y. Ikeda, J. Biochem. (Tokyo), **64**, 321 (1968).
4. U. K. Laemmli, Nature, **227**, 680 (1970).
5. J. B. Boyd, H. K. Mitchell, Anal. Biochem., **13**, 28 (1965).

DETERMINAREA PROTEINELOR PRIN METODA LOWRY ÎN PREZENŢA ACIDULUI BORIC

M. ZAMFIR

Rezumat. Sînt prezentaţi principalii factori ai interferenţei acidului boric în determinarea proteinelor prin metoda Lowry. În acest sens au fost considerate mai multe situaţii posibile : 1) interferenţa acidului boric în determinarea proteinelor în prezenţa glucidelor ; 2) interferenţa acidului boric în determinarea proteinelor şi a glicoproteinelor în absenţa zaharurilor ; 3) interferenţa acidului boric în determinarea proteinelor în diferite etape ale reacţiei Lowry.
Rolul inhibitor al acidului boric în determinarea proteinelor prin metoda Lowry este general, manifestîndu-se în toate etapele determinării. De aceea, determinarea proteinelor prin metoda Lowry în prezenţa acidului boric şi a zaharurilor nu este indicată.

Deşi nici prin sensibilitate şi nici prin specificitate metoda Lowry nu este perfectă, ea s-a impus totuşi datorită rapidităţii, simplităţii, reproductibilităţii şi în general eficienţei sale, ajungînd să constituie mijlocul cel mai larg acceptat de exprimare a concentraţiei proteinelor. Din această cauză este normală necesitatea studierii aspectelor privitoare la aplicarea sa. În conformitate cu o asemenea necesitate, lucrarea de faţă se ocupă cu determinarea proteinelor prin metoda Lowry atunci cînd acestea conţin în structura lor părţi glucidice sau se găsesc în prezenţa glucidelor. În aceste situaţii este de aşteptat ca, în funcţie de prezenţa glucidelor, a părţilor glucidice ale unor proteine sau, pur şi simplu, a anumitor părţi din moleculele proteinelor, să existe o anumită influenţă a acidului boric, frecvent întrebuinţat la prepararea unor tampoane (1), (2). Această situaţie constituie scopul prezentei lucrări.

MATERIAL ŞI METODE

În această lucrare s-a folosit tehnica Lowry (3) conform variantei Miller (4). La 1 ml probă se adaugă 1 ml reactiv Miller şi, după un repaus de 10 min, se adaugă 3 ml reactiv Folin-Ciocâlteu diluat (1 volum reactiv + 10 volume apă). Probele au fost termostatate în baie de apă la + 51°C (± 0,1°C). Citirile s-au făcut la trei lungimi de undă (750, 660 şi 540 nm) la un spectrofotometru Spekol, folosindu-se cuve cu un drum optic de 1 cm. Pentru etapa biuretică a reacţiei s-au folosit, de asemenea, trei lungimi de undă (330, 540 şi 650 nm).

Reactivul Folin-Ciocâlteu şi reactivul Miller au fost preparaţi în modul cunoscut (3), (4), din substanţe de puritate analitică.

Substanţele folosite pentru determinările propriu-zise au fost : albumină serică bovină (Calbiochem), pepsină de porc (Merck), manoză (Merck), streptomicină (F.A. Iaşi), sulfat de protamină (N.B.C.), bactopeptonă (Difco), cazeină solubilă (B.D.H.) şi tireoglobulină umană electroforetic pură (soluţie de tampon tris-HCl). Această substanţă provenea de la Institutul de endocrinologie „C. I. Parhon", laboratorul de imunologie. Am folosit streptomicină datorită structurii sale polizaharidice.

Toate probele au fost executate în triplicat şi valorile prezentate ar fi trebuit să fie mediile acestor trei valori. Acest lucru nu a fost necesar deoarece în marea majoritate a cazurilor valorile coincideau. Deşi exprimarea concentraţiei proteinelor faţă de curbele etalon de albumină serică bovină ar fi fost posibilă, nu am procedat astfel pentru că nu se aducea nici o precizare suplimentară în privinţa problemelor care ne interesează.

Precizez că întotdeauna cînd vorbesc despre adaosul acidului boric, mă refer la soluţia saturată de acid boric în apă (la temperatură ambiantă).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În cazul tuturor compuşilor se constată la toate lungimile de undă o scădere a densităţii optice la probele cărora li s-a adăugat soluţie de acid boric. Această scădere este dependentă de natura compusului şi variază în limite foarte largi (tabela 1).

Tabela 1

Valorile densităţii optice la 750, 660 şi 540 nm pentru diferite proteine şi compuşi care interferă cu ele, în absenţa acidului boric (coloana din stînga fiecărei lungimi de undă) şi în prezenţa acidului boric (coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă)

Compusul	Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
	750		660		540	
Albumină serică bovină 640 ng/ml	0,29	0,10	0,23	0,075	0,14	0,045
Pepsină 640 ng/ml	0,32	0,18	0,26	0,14	0,16	0,08
Tireoglobulină 640 ng/ml	0,33	0,11	0,29	0,10	0,19	0,08
Sulfat de protamină 1000 ng/ml	0,23	0,09	0,19	0,08	0,13	0,07
Bactopeptonă 4000 ng/ml	0,68	0,30	0,58	0,25	0,38	0,17
Cazeină solubilă 800 ng/ml	0,23	0,10	0,19	0,08	0,12	0,06
Streptomicină 1000 ng/ml	1,90	0,20	1,45	0,17	0,96	0,12

Notă. În prezenţa acidului boric, proba conţine 0,1 ml compus şi 0,9 ml acid boric soluţie saturată. În absenţa acidului boric, proba conţine 0,1 ml compus şi 0,9 ml apă. În ambele cazuri, martorii conţin apă în locul compusului.

Este evident că adaosul acidului boric exercită un efect inhibitor asupra dezvoltării coloraţiei caracteristice a proteinelor. Acest lucru s-ar putea datora :

a) reacţiei acidului boric cu resturile glucidice din structura proteică (aşa cum ar fi cazul tireoglobulinei umane) sau cu zaharurile prezente ;

b) reacţiei acidului boric cu însăşi molecula proteică ;

c) reacţiei acidului boric cu unele, sau influenţa acidului boric asupra unor ingrediente ale reactivului Miller (Cu^{++}, tartrat, eventual citrat) ;

d) reacţiei acidului boric cu reactivul Folin-Ciocâlteu.

Multitudinea acestor posibilităţi a făcut necesară eliminarea pe rînd a cîte unui factor. De aceea, într-o primă etapă am urmărit variaţia densităţii optice în funcţie de cantitatea de acid boric în condiţiile men-

ținerii constante a cantității de proteină (pepsină 640 μg/ml) și a celei cu Cu^{++} din reactivul Miller, în cazul folosirii tartratului și citratului ca agenți de complexare. Tartratul și citratul s-au folosit o dată în concentrație normală (tabela 2), altă dată în concentrație dublă (tabela 3).

Tabela 2

Variația densității optice la 750, 660 și 540 nm cu concentrația de acid boric pentru aceeași cantitate de proteină (pepsină 640 μg/ml), folosind reactiv Miller preparat o dată cu tartrat (coloana din stînga fiecărei lungimi de undă) și altă dată cu citrat (coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă), în concentrații normale

ml acid boric	Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
	750		660		540	
1,0	0,13	0,13	0,12	0,07	0,07	0,06
0,8	0,16	0,13	0,13	0,09	0,08	0,07
0,6	0,17	0,16	0,13	0,12	0,09	0,08
0,4	0,21	0,20	0,17	0,15	0,10	0,09
0,2	0,24	0,26	0,20	0,17	0,12	0,11
0,0	0,27	0,28	0,21	0,22	0,12	0,14

Notă. La 0,01 ml pepsină 640 μg/ml s-au adăugat cantitățile de acid boric indicate în tabel, restul pînă la 1 ml fiind apă. Ultima probă, adică martorul, nu conținea acid boric deloc.

Tabela 3

Variația densității optice la 750, 660 și 540 nm cu concentrația de acid boric pentru aceeași cantitate de proteină (pepsină 640 μg/ml), folosind reactiv Miller preparat o dată cu tartrat (coloana din stînga fiecărei lungimi de undă) și altă dată cu citrat (coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă), în concentrații duble față de cele normale

ml acid boric	Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
	750		660		540	
1,0	0,14	0,12	0,11	0,07	0,07	0,04
0,8	0,15	0,12	0,12	0,08	0,08	0,05
0,6	0,17	0,15	0,13	0,11	0,09	0,07
0,4	0,21	0,17	0,16	0,13	0,10	0,08
0,2	0,25	0,23	0,19	0,17	0,12	0,11
0,0	0,27	0,40	0,20	0,34	0,13	0,22

Notă. La 0,1 ml pepsină 640 μg/ml s-au adăugat cantitățile de acid boric indicate în tabel, restul pînă la 1 ml fiind apă. Ultima probă, adică martorul, nu conținea acid boric deloc.

Se constată în ambele situații la toate lungimile de undă o scădere a densității optice, care crește cu cantitatea de acid boric, ceea ce probează efectul inhibitor al acestuia, indiferent de natura complexantului.

De asemenea, este de notat că, deşi mici, diferenţele dintre citrat şi tartrat există, ele fiind în general favorabile tartratului, în cazul căruia acidul boric are un efect mai puţin pronunţat. Acest fapt este explicabil prin aceea că probabil acidul boric nu acţionează în mod direct asupra complexantului, întrucît, dacă ar acţiona, diferenţele dintre citrat (un acid tribazic monohidroxilic) şi tartrat (un acid bibazic, dar un diol) ar fi de aşteptat să fie cu mult mai mari şi, oricum, tartratul ar trebui să fie cel mai „inhibat", ca avînd posibilităţi de reacţie mai mari cu acidul boric. În privinţa practicii determinării este evident că folosirea citratului este mai puţin recomandabilă în prezenţa acidului boric.

Folosirea într-un alt experiment (tabelele 4 şi 5) a unei variaţii de concentraţie cu mult mai mare a agenţilor de complexare ne-a confirmat o dată în plus : a) efectul inhibitor al acidului boric asupra dezvoltării culorii ; b) independenţa acestui efect de concentraţia complexantului ;

Tabela 4

Dependenţa densităţii optice la 750, 660 şi 540 nm, pentru aceeaşi cantitate de proteină (0,01 ml pepsină 640 μg/ml), faţă de concentraţia de tartrat din reactivul Miller în condiţiile : a) adaosului de acid boric (1 ml, în coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă) şi b) lipsei acidului boric şi înlocuirii sale prin apă (1 ml, în coloana din stînga fiecărei lungimi de undă)

Concentraţia tartratului (%)	Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
	750		660		540	
10	0,27	0,16	0,22	0,13	0,14	0,08
5	0,27	0,16	0,22	0,13	0,14	0,08
4	0,27	0,15	0,22	0,13	0,14	0,08
3	0,27	0,16	0,23	0,12	0,14	0,08
2	0,27	0,16	0,22	0,13	0,14	0,08
1	0,26	0,16	0,22	0,13	0,14	0,08

Tabela 5

Dependenţa densităţii optice la 750, 660 şi 540 nm, pentru aceeaşi cantitate de proteină (0,01 ml pepsină 640 μg/ml), faţă de concentraţia de citrat din reactivul Miller în condiţiile : a) adaosului de acid boric (1 ml, în coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă) şi b) lipsei acidului boric şi înlocuirii sale prin apă (1 ml, în coloana din stînga fiecărei lungimi de undă)

Concentraţia citratului (%)	Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
	750		660		540	
10	0,42	0,14	0,35	0,11	0,22	0,06
5	0,42	0,14	0,35	0,11	0,22	0,06
4	0,43	0,14	0,35	0,11	0,22	0,06
3	0,42	0,14	0,35	0,11	0,22	0,06
2	0,42	0,14	0,35	0,11	0,24	0,06
1	0,42	0,14	0,35	0,11	0,22	0,06

c) interferența mai pronunțată a citratului în reacție, deoarece, indiferent de prezența sau de absența acidului boric, este mai oxidabil decît tartratul, conducînd la valori ale densității optice cam cu 60% mai mari.

Adaosul într-un alt experiment al unor concentrații variabile de cupru în reactivul Miller la probe cu și fără adaos de acid boric, menținînd concentrația proteinei constantă, a condus la rezultate de același tip: a) acidul boric inhibă în toate situațiile reacția; b) această inhibiție este independentă de concentrația de cupru; c) folosirea celor doi complexanți la diferite concentrații de cupru nu conduce la diferențe semnificative. Singura deosebire este că, la depășirea a două ore de la adaosul reactivului Miller la proba proteică, în cazul citratului culoarea albastră a complexului dispare și, odată cu dispariția ei, se formează un precipitat roșiatic de Cu_2O, ceea ce confirmă necesitatea evitării citratului, mult mai oxidabil decît tartratul.

Influența zaharurilor asupra determinării proteinelor prin metoda Lowry este un fapt binecunoscut (5). Din această cauză, suprapunerea influenței acidului boric, susceptibil de a reacționa cu zaharurile, a părut un fapt interesant.

Tabela 6

Variația densității optice la 750, 660 și 540 nm în funcție de cantitatea de acid boric adăugată unui amestec de proteină și zahăr

Compoziția probei				Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)		
ml acid boric	ml apă	ml pepsină 640 μg/ml	ml manoză 0,5 g/ml	750	660	540
—	2,0	0,02	—	0,28	0,24	0,15
1,0	—	0,02	1,0	0,31	0,26	0,18
0,8	0,2	0,02	1,0	0,45	0,40	0,27
0,6	0,4	0,02	1,0	0,48	0,42	0,29
0,4	0,6	0,02	1,0	0,49	0,44	0,30
0,2	0,8	0,02	1,0	0,54	0,49	0,34
—	1,0	0,02	1,0	0,62	0,58	0,42
1,0	1,02	—	—	0,0	0,0	0,0
—	2,02	—	—	0,0	0,0	0,0
1,0	0,02	—	1,0	0,21	0,16	0,08

Prin urmare, într-unul din experimentele noastre am urmărit variația densităților optice la cele trei lungimi de undă, în funcție de cantitatea de acid boric adăugată unei soluții care conținea o cantitate constantă de proteină și zahăr (0,02 ml pepsină 640 μg/ml și 1 ml manoză 0,5 g/ml). Și în acest caz se constată scăderea densităților optice pe măsură ce cantitatea de acid boric crește.

În toate situațiile de care ne-am ocupat am observat că adaosul acidului boric inhibă formarea culorii caracteristice a complexului biuretic al cuprului cu proteina. Acest lucru este cu atît mai surprinzător cu cît nu am putut detecta în amestecul de reacție nici scăderea pH-ului și nici scăderea densității optice caracteristice reacției biuretului. Totuși, într-un experiment am putut surprinde la 540 nm scăderea densității optice odată cu creșterea cantității de manoză față de cantitatea de proteină. Acidul boric nu a determinat nici o schimbare. Deși nu foarte clară, interferența acidului boric în prima treaptă a reacției Lowry este certă. Participarea sa și în altă treaptă a reacției nu poate fi însă exclusă. Pentru a stabili acest lucru, într-un alt experiment am executat reacția cu cantități constante de proteină și cantități variabile de manoză, folosind o variantă normală și o a doua în care am diluat reactivul Folin-Ciocâlteu cu acid boric în loc de apă.

Tabela 7

Variația densității optice la 750, 660 și 540 nm pentru proteine în prezența zaharurilor folosind: a) reactiv Folin-Ciocâlteu preparat în mod obișnuit (coloana din stînga fiecărei lungimi de undă) și b) reactiv Folin-Ciocâlteu diluat cu acid boric (coloana din dreapta fiecărei lungimi de undă)

Compoziția amestecului de reacție			Lungimile de undă la care s-au citit probele (nm)					
ml apă	ml manoză 0,5 g/ml	ml pepsină 640 μg/ml	750		660		540	
1,1	0,9	—	0,25	0,19	0,22	0,09	0,15	0,06
1,1	0,9	0,02	0,64	0,24	0,59	0,19	0,41	0,14
1,3	0,7	0,02	0,58	0,22	0,52	0,17	0,36	0,12
1,5	0,5	0,02	0,58	0,19	0,52	0,15	0,36	0,10
1,7	0,3	0,02	0,48	0,19	0,42	0,15	0,29	0,10
1,9	0,1	0,02	0,38	0,15	0,32	0,12	0,21	0,08
2	—	0,02	0,28	0,13	0,23	0,10	0,14	0,08
2,02	—	—	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Rezultatele au demonstrat și în această situație efectul inhibitor al acidului boric, ceea ce dovedește, după părerea noastră, participarea sa în toate etapele acestei determinări.

CONCLUZII

Cercetîndu-se efectele asupra desfășurării reacției Lowry, s-au constatat următoarele:

1. Acidul boric, deși nu se combină cu tartratul, citratul sau Cu^{++}, determină o inhibiție a treptei biuretice a reacției.

2. Zaharurile prezente (manoza) nu pot elimina efectul inhibitor al acidului boric. Acidul boric se manifestă chiar față de ele ca un inhibitor, atunci cînd sînt „determinate" prin reacția Lowry.

3. Acidul boric se combină cu molecula proteică, făcînd-o, într-un fel oarecare, indisponibilă pentru reacția Lowry.

4. Acidul boric adăugat ca diluant reactivului Folin-Ciocâlteu determină scăderea capacităților sale de reacție cu proteinele, împiedicînd, probabil, reducerea reactivului.

5. Acidul boric și citratul sînt substanțe neindicate în determinarea proteinelor prin reacția Lowry ; zaharurile au și ele efecte foarte pronunțate.

Mulțumesc tov. dr. Ligia Simionescu, șeful Laboratorului de imunologie al Institutului „C. I. Parhon", pentru tireoglobulina umană.

Prezentat la redacție
la 26 mai 1980

Institutul de științe biologice, București

THE DETERMINATION OF PROTEINS BY THE LOWRY METHOD IN THE PRESENCE OF BORIC ACID

SUMMARY

The most important factors which make possible the interference of boric acid in protein determination by the Lowry method are presented. The most probable situations are therefore considered : 1) The interference of boric acid in the determination of proteins when saccharides were present. 2) The interference of boric acid in the determination of proteins and glycoproteins when saccharides were not present. 3) The interference of boric acid in the determination of proteins when added in different steps of the Lowry method.

The inhibitive role of boric acid in the determination of proteins by the Lowry method is general, it existing in all steps of the Lowry method. For that reason the determination of proteins by the Lowry method is not recommended in the presence of both boric acid and saccharides.

BIBLIOGRAFIE

1. Prideaux, Ward, J. chem. Soc., **125**, 426 (1924).
2. H. T. S. Britton, *Hydrogen Ions*, vol. 1, Chapman and Hall, London, 1955, p. 364.
3. O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, H. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **177**, 75 (1951).
4. G. L. Miller, R. Blum, W. E. Glennon, A. L. Burton, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
5. H. Schuel, R. Schuel, Anal. Biochem., **20**, 86–93 (1967).

PRODUCEREA CELULAZELOR DE CĂTRE *ASPERGILLUS NIGER* CULTIVAT PE MEDII DE CULTURĂ NATURALE (SUBPRODUSE ŞI DEŞEURI ALE INDUSTRIEI ALIMENTARE)

M. ZAMFIR, S. VASU

Rezumat. S-a urmărit dinamica producerii de celulaze intra- şi extracelulare de către *Aspergillus niger* cultivat pe medii de cultură derivate de la deşeuri şi subproduse ale industriei alimentare. În acest sens s-au experimentat medii pe bază de şroturi de soia şi floarea-soarelui, melasă şi tărîţe de grîu. Cea mai mare producţie de celulaze se obţine în culturile agitate, celulazele extracelulare predominînd net asupra celor intracelulare şi găsindu-se în lichidele de cultură.

Celulazele produse în diferite microorganisme (1), bacterii (2), (3) şi fungi (4), (5), (6), (7), (8) au fost studiate pentru interesul pe care îl prezintă. *Aspergillus niger* (8), (9), (10), *Curvularia lunata* (11), *Trichoderma viride* (5), (12) şi alte microorganisme au fost folosite pentru obţinerea de preparate celulazice.

În cercetări anterioare ne-am preocupat de selectarea unor tulpini şi mutante de *A. niger* (13) cu activitate celulazică apreciabilă, crescute pe diferite surse de carbon şi azot (14).

Prezentăm în lucrarea de faţă rezultatele cercetărilor privind producerea de celulaze în culturi de *A. niger*, realizate pe medii de cultură naturale, subproduse şi deşeuri ale industriei alimentare.

MATERIALE ŞI METODE

S-a folosit tulpina sălbatică *A. niger* ICA-34 (colecţia ICICA, Bucureşti). Au fost realizate culturi de suprafaţă şi agitate (prin agitare rotativă la 150 rotaţii/min) la 28°C, în flacoane Erlenmeyer de 750 ml, care conţineau cîte 150 ml mediu sterilizat prin autoclavare 30 min la 0,5 atm. Fiecare balon era însămînţat steril cu 6×10^6 spori. Mediile de cultură au fost : cu şroturi, cu melasă, cu tărîţe şi mediul Raulin (15).

Mediul cu şrot de soia conţinea amidon (indigen comercial sau BDH), şrot de soia, extract de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 şi $CaCO_3$.

Mediul cu şrot de floarea-soarelui conţinea amidon comercial indigen, şrot de floarea-soarelui, extract de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, KH_2PO_4 şi $CaCO_3$.

La aceste medii, şroturile se fierbeau în jumătate din volumul final de apă ; apoi, fiertura era filtrată prin vată şi tifon dublu şi era adăugată celorlalte ingrediente.

Mediul cu melasă şi cationi conţinea melasă, $ZnSO_4$, 7 H_2O, $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, $CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$, KH_2PO_4 şi ulei de soia.

Mediul cu melasă şi $K_4[Fe(CN)_6]$ conţinea melasă, $K_4[Fe(CN)_6]$, H_3PO_4 (densitate 1,75) şi ulei de soia.

Tuturor mediilor li se ajusta pH-ul şi apoi erau sterilizate.

Mediul cu tărîţe conţinea tărîţe, morcovi raşi, H_2SO_4 şi apă. Acest mediu era trecut după fierbere în tăvi emailate într-un strat gros de circa 2 cm.

Miceliul de diferite vîrste, din probe diferite, a fost separat de mediul de cultură prin filtrare pe pînză de nylon, fiind spălat repede cu apă distilată şi uscat cu hîrtie de filtru ; lichidul de cultură a fost adus la 200 ml, folosindu-se apele de spălare ale miceliului. O parte din miceliul uscat a fost folosit pentru determinarea greutăţii uscate la 105°C şi pentru obţinerea omogenatului de miceliu prin mojarare cu nisip de cuarţ, suspendare în apă (1/10 g/v), extragere la rece timp de 24 de ore, centrifugare la 4000 rotaţii/min 15 min.

Determinarea activităţii celulazice s-a efectuat conform metodei Miller şi colab. (16), la pH 4,5 (8). La 0,2 ml extract enzimatic s-au adăugat 2 ml CM-celuloză sodică (Austranal) 1% în tampon acid acetic-acetat 0,5 M de pH 4,5 (în eprubeta probei martor s-a adăugat numai substrat). Toate eprubetele s-au incubat 15 min la 40°C, după care s-au adăugat imediat 3 ml reactiv 3,5-dinitrosalicilic în fiecare eprubetă (întîi probelor, apoi martorilor). Martorilor li s-au adăugat cîte 0,2 ml extract enzimatic corespunzător probelor şi toate probele s-au fiert 15 min în baie de apă. S-au răcit în baie de apă cu gheaţă şi s-au centrifugat 15 min la 4000 rotaţii/min. S-au reţinut numai supernatantele, citindu-se proba faţă de martor (Spekol, 1 = 1cm) la 640 nm şi obţinîndu-se astfel $DO_{640\ nm}$.

Activitatea celulazică a fost exprimată în unităţi de activitate, unitatea fiind cantitatea de enzimă capabilă să determine creşterea $DO_{640\ nm}$ cu o unitate în condiţiile testului de mai sus.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Cultivarea lui *Aspergillus niger* pe medii cu şrot de soia şi amidon BDH la două valori de pH (4,0 şi 6,8) a demonstrat că celulazele extracelulare la pH 6,8 sînt maxime în culturile de suprafaţă, iar la pH 4,0 sînt maxime în culturile agitate. Celulazele intracelulare sînt însă la ambele pH-uri mai mari în culturile de suprafaţă. Aşa cum reiese din tabela 1,

Tabela 1

Producerea de miceliu şi celulaze intra- şi extracelulare de către *A. niger* ICA-34, la 3 zile, pe mediu cu şrot de soia şi amidon BDH în culturi de suprafaţă şi agitate, la două valori de pH

pH-ul culturii	Felul culturii	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
4,0	agitată	1,113	1752	25,0	70,0
	de suprafaţă	1,082	1562	46,3	33,7
6,8	agitată	1,675	982	35,5	27,6
	de suprafaţă	0,769	2511	62,6	40,0

producerea de miceliu urmează o regulă inversă, fiind la ambele pH-uri mai abundentă pentru culturile agitate. Aceste fapte îşi găsesc confirmarea şi în tabela 2, în care se prezintă rezultate destinate să decidă asupra utilizării amidonului indigen comercial în locul celui BDH. În afară de cele observate în tabela 1, în tabela 2 se mai poate vedea că mediul cu amidon comercial se comportă similar celui cu amidon BDH, la pH 6,5 avînd însă pentru ambele tipuri de celulaze valori apreciabil mai mari. Se mai poate observa, în cazul acestei experienţe, că raportul celulazelor extracelulare faţă de cele intracelulare este mai mare la culturile de suprafaţă, efectul fiind mai amplu la pH 6,5. Este de la sine înţeles că aceste date nu au semnificaţie decît în legătură cu procesul de creştere a miceliului de *A. niger*. De aceea am căutat să urmărim evoluţia lor în timp.

Tabela 2

Producerea de miceliu și celulaze intra- și extracelulare de către *A. niger* ICA-34, la 3 zile, în culturi de suprafață și agitate pe medii cu șrot de soia și două tipuri de amidon (BDH și indigen comercial)

Tipul de amidon	pH-ul culturii	Felul culturii	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
indigen comercial	4,0	agitată	2,282	1281	37,0	34,6
		de suprafață	0,997	4234	73,3	57,7
	6,5	agitată	2,170	778	11,4	68,5
		de suprafață	0,564	8952	30,2	238,4
BDH	6,5	agitată	4,068	319	14,0	21,5
		de suprafață	0,765	6835	27,8	245,4

În tabela 3 sînt prezentate toate datele privind creșterea unui miceliu de *A. niger* pe mediu cu șrot de soia în decurs de 10 zile. Producția de miceliu pentru culturile agitate scade continuu, în timp ce pentru culturile de suprafață scade pînă în ziua a 5-a, după care crește brusc în ziua

Tabela 3

Producerea de miceliu și celulaze intra- și extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediu cu șrot de soia în culturi de suprafață și agitate în funcție de vîrstă (pH-ul inițial 6,05)

Vîrsta (zile)	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
Culturi agitate				
3	2,971	408	33,3	12,2
5	2,4686	1188	19,1	62,0
7	0,791	3862	8,5	451,2
9	0,597	5510	2,4	2277,2
11	0,4447	6539	1,3	5530,2
Culturi de suprafață				
3	1,000	32	43,0	0,5
5	0,853	3352	22,4	150,0
7	2,374	1752	22,3	78,6
9	2,049	2125	10,2	208,4
11	1,370	3509	8,8	395,3

a 7-a, scăderea care urmează fiind lentă. Această evoluție în timp este în același sens cu activitatea celulazică extracelulară, care crește continuu la cultura agitată, atingînd valoarea maximă în ziua a 10-a, în timp ce la cultura de suprafață activitatea celulazică extracelulară crește pînă în ziua a 5-a, după care scade și apoi crește din nou pînă în ziua a 10-a, atingînd valoarea maximă. Activitatea celulazică intracelulară scade însă la ambele tipuri de cultură cu vîrsta. Raportul celulazelor extracelulare

faţă de cele intracelulare are la ambele culturi o variaţie cu vîrsta analogă variaţiei producerii de miceliu şi celulaze extracelulare. Aceste date sugerează că pentru cultura statică între zilele a 5-a şi a 7-a este momentul cînd miceliul trece la o altă formă de creştere. Producţiile maxime însă apar în ziua a 10-a.

Tabela 4

Producerea de miceliu şi celulaze intra- şi extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediu cu şrot de floarea-soarelui în culturi agitate şi de suprafaţă, în funcţie de vîrstă (H iniţial 6,3)

Vîrsta (zile)	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
Culturi agitate				
2	3,523	697	2,5	275,2
3	1,667	2300	35,0	17,7
5	3,175	1310	63,0	20,8
7	1,630	2513	0,0	—
9	2,760	1578	0,0	—
12	1,224	3718	0,0	—
Culturi de suprafaţă				
2	0,336	11600	5,0	2316,0
3	0,551	37756	20,7	1919,6
5	0,760	7352	8,2	899,4
7	0,884	5149	20,2	254,5
9	1,130	4605	20,8	211,1
12	1,070	4919	11,2	4010,7

Mediul cu şrot de floarea-soarelui (tabela 4) prezintă cu totul alte regularităţi, care derivă neîndoielnic din posibilităţile diferite de a hrăni miceliul. Astfel, la mediul cu şrot de soia, producţia de miceliu este mai mare în culturi agitate numai pînă în ziua a 5-a, după care situaţia se inversează, în timp ce la miceliul cu şrot de floarea-soarelui producţia de miceliu este mereu mai mare în culturile agitate decît în cele de suprafaţă de aceeaşi vîrstă. Pe mediul cu şrot de floarea-soarelui, producţia de miceliu în culturile agitate scade cu vîrsta, ca şi pe mediul cu şrot de soia, dar la culturile de suprafaţă, dimpotrivă, pe mediul cu şrot de floarea-soarelui producţia de miceliu creşte cu vîrsta. Celulazele extracelulare sînt la mediul cu şrot de floarea-soarelui maxime în ultima zi, în general crescînd cu vîrsta şi fiind cu atît mai mari cu cît este mai mică producţia de miceliu. Celulazele extracelulare sînt pentru culturile de suprafaţă maxime în ziua a 3-a, ele scăzînd apoi cu vîrsta şi totodată cu creşterea producţiei de miceliu. Şi în privinţa celulazelor intracelulare cele două medii se manifestă diferit. Pe mediul cu şrot de soia, în culturi agitate există o scădere continuă cu vîrsta, în timp ce pe mediul cu şrot de floarea-soarelui ele cresc pînă în ziua a 5-a, după care dispar cu totul. În culturile de suprafaţă situaţia este de asemenea diferită, la mediul cu şrot de soia celulazele intracelulare scăzînd cu vîrsta, în timp ce la mediul cu şrot de floarea-soarelui valoarea maximă apare în ziua a 9-a. Raportul celulazelor extra-

celulare față de cele intracelulare la cele două medii arată deosebiri mari, sugerînd faze de durate deosebite. Astfel, pentru culturile de suprafață evoluția sa în timp ar sugera, la miceliul crescut pe mediul cu șrot de soia, o dezvoltare în două etape, iar la cel crescut pe mediul cu șrot de floarea-soarelui o dezvoltare într-o singură etapă. Mai slab la culturile agitate, mediul cu șrot de floarea-soarelui este însă cu mult mai bun decît cel cu șrot de soia în culturi de suprafață pentru producerea celulazelor extracelulare, aceasta cu atît mai mult cu cît timpul de cultură este mai scurt (3 zile). Din punctul de vedere al celulazelor intracelulare, mediul cu șrot de floarea-soarelui este, de asemenea, mai bun în culturile agitate decît cel cu șrot de soia. În culturile de suprafață, situația se inversează, dar, dacă avem în vedere valorile timpilor la care se obțin, mediul cu șrot de floarea-soarelui este mai bun.

În privința mediilor cu melasă, au fost experimentate două formule, în scopul selectării dintre multiplii factori de compoziție, care influențează producția de celulază, a unuia a cărui influență ne-a părut hotărîtoare, și anume prezența unui grup de cationi: Zn^{++}, Cu^{++}, Mg^{++}, care au fost adăugați într-un mediu (tabela 5), iar în altul (tabela 6) nu numai că au lipsit, dar au și fost mascați prin complexare cu $K_4[Fe(CN)_6]$ cei care ar fi existat în compoziția melasei.

Tabela 5

Producerea de miceliu și celulaze intra- și extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe medii cu melasă și cationi în culturi agitate și de suprafață, în funcție de vîrstă (pH-ul inițial 6,0)

Vîrsta (zile)	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
		Culturi agitate		
3	1,424	1917	21,4	89,5
5	5,965	871	11,6	75,0
7	2,773	375	9,5	39,6
10	4,094	1778	12,0	140,2
		Culturi de suprafață		
3	3,107	1908	11,8	89,5
5	9,026	185	6,1	30,3
7	3,262	1753	0,0	—
10	5,576	1401	6,7	207,8

În cazul acestor medii sînt atît deosebiri, rezultate din diferențele de compoziție introduse de noi, cît și asemănări, care le conferă o pronunțată omogenitate. La mediul cu melasă și adaos de cationi, producția de micelii este în culturile agitate mereu inferioară celei din culturile de suprafață, la aceeași vîrstă maximul fiind, în ambele cazuri, în ziua a 5-a. La mediul cu ferocianură, numai la începutul și la sfîrșitul intervalului

există asemenea situaţii, maximele fiind la cultura agitată în a 7-a zi, iar la cultura de suprafaţă în a 10-a zi. Celulazele extracelulare au în ambele cazuri aceeaşi evoluţie în timp, fiind maxime în toate situaţiile în ziua a 3-a (deci la începutul intervalului) şi scăzînd continuu cu timpul la culturile de suprafaţă, în timp ce la culturile agitate mai apare un maxim în ultima zi. Valorile sînt mai mari la mediul cu melasă şi ferocianură şi din punctul de vedere al celulazelor intracelulare; mediul cu ferocianură este mai productiv, cu toate că îşi realizează valorile maxime mai tîrziu

Tabela 6

Producerea de miceliu şi celulaze intra- şi extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediu cu melasă şi $K_4[Fe(CN)_6]$ în culturi agitate şi de suprafaţă, în funcţie de vîrstă (pH-ul iniţial 6,0)

Vîrsta (zile)	Greutatea miceliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
		Culturi agitate		
3	0,108	10250	5,4	1884,5
5	2,678	998	9,0	110,4
7	7,274	402	0,3	1181,6
10	0,840	2864	27,7	103,0
		Culturi de suprafaţă		
3	1,208	4732	7,6	619,2
5	2,347	1384	25,4	54,5
7	2,061	662	18,3	36,1
10	3,457	526	3,1	168,4

decît cel cu melasă şi cationi. Mediul acesta are valoarea maximă a celulazelor intracelulare în ziua a 3-a, după care scade la culturile agitate pînă în ziua a 10-a (cînd mai creşte o dată), iar la culturile de suprafaţă în mod continuu. Mediul cu ferocianură atinge la culturile agitate valoarea maximă în ultima zi (a 10-a), iar la culturile statice în ziua a 5-a. Aceste valori sînt destul de apropiate, încît cultura de suprafaţă ar părea preferabilă, necesitînd mai puţin timp. Raportul celulazelor extracelulare faţă de cele intracelulare sugerează deosebiri apreciabile între cele două tipuri de medii. În culturile agitate, mediul cu melasă şi cationi pare a evolua într-o singură etapă, iar cel cu ferocianură în două etape. La culturile de suprafaţă, diferenţa apare şi mai netă, dar mai dificil de interpretat.

Testarea mediului solid, care s-a dovedit bun pentru producerea altor enzime (16) şi de la care ar fi fost de aşteptat acelaşi lucru şi pentru celulaze (17), nu a dat satisfacţie, activitatea nedepăşind 80 U/g mediu uscat. Aceasta ne determină să nu-l recomandăm.

Celulazele produse pe mediul Raulin sînt mari în lichidul de cultură, dar mai mici de circa 7 ori decît cele produse pe mediul cu şrot de floarea-soarelui, iar în omogenat de circa 3 ori faţă de cele produse pe mediul menţionat. Valorile corespunzătoare se găsesc în tabela 7.

Tabela 7

Producerea de miceliu și celulaze intra- și extracelulare de către *A. niger* ICA-34 cultivat pe mediul Raulin în culturi agitate și de suprafață, în funcție de vîrstă (pH-ul inițial 6,0)

Vîrsta (zile)	Greutatea micheliului uscat (g)	Celulaze extracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze intracelulare (U/g miceliu uscat)	Celulaze extracelulare / Celulaze intracelulare
		Culturi agitate		
2	0,814	4641,0	18,2	257,7
3	1,405	1040,0	5,5	189,0
5	2,650	0,0	5,4	0,0
7	2,760	1170,0	4,1	285,3
10	2,217	598,0	1,2	498,3
		Culturi de suprafață		
2	0,920	0,0	2,1	0,0
3	1,898	1300,0	7,5	173,3
5	3,312	0,0	4,9	0,0
7	3,071	357,0	1,8	240,0

CONCLUZII

1. Dintre mediile folosite la producerea celulazelor de către *A. niger*, cel mai bun se dovedește a fi mediul cu șrot de floarea-soarelui (cultura de suprafață de 3 zile). Același mediu se dovedește a fi cel mai bun și pentru producerea de către *A. niger* a celulazelor intracelulare (cultura agitată de 5 zile).

2. Pe mediile folosite, celulazele produse de *A. niger* sînt eliberate în marea majoritate în lichidele de cultură, putînd fi considerate enzime extracelulare.

3. Cele mai mari valori ale celulazelor extracelulare produse de *A. niger* se obțin pe mediile agitate (excepție mediul cu șrot de floarea-soarelui).

Prezentat la redacție
la 27 mai 1980

Institutul de științe biologice, București

PRODUCTION OF CELLULASES BY *ASPERGILLUS NIGER* GROWN ON NATURAL CULTURE MEDIA (BY-PRODUCTS AND WASTES FROM FOOD INDUSTRY)

SUMMARY

The dynamics of intra- and extracellular cellulases production by fungus *Aspergillus niger* grown on culture media, derived from wastes and by-products of food industry, was followed.

For that reason media containing mainly sun flower and soybean groats, molasses and wheaten bran were used in various experiments.

The highest production of cellulases was obtained in shaken cultures, the extracellular enzymes being preponderant upon the intracellular ones and located in culture filtrates.

BIBLIOGRAFIE

1. C. C. Selby, K. Haitoland, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 254 (1967).
2. B. Berg, Canad. J. Microbiol., **21**, 51 (1975).
3. C. Breuil, D. J. Kusner, Canad. J. Microbiol., **22**, 1776 (1976).
4. B. Bucht, E. Erikson, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 135 (1968).
5. C. Petterson, D. L. Eaker, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 154 (1968).
6. P.O. Olutiola, Canad. J. Microbiol., **22**, 1153 (1976).
7. K.-E. Brikson, O. Pettersson, Arch. Biochem. Biophys., **124**, 160 (1968).
8. C. S. Walseth, Tappi, **55**, 233 (1952).
9. L. H. Li, R. M. Flora, K. W. King, J. Ferment. Technol., **41**, 98 (1963).
10. *Enzymes in Food Processing*, sub red. O. Reed, ed. a 2-a, Academic Press, San Francisco—London, 1969, p. 139.
11. J. Contat, teză de doctorat, Paris, 1969.
12. C. Costa, teză de doctorat, Lyon, 1966.
13. S. Vasu, Vl. Gheordunescu, M. Zamfir-Grigorescu, Magdalena Dedu, Rodica Birnescu, Ioana Gomoiu, comunicare la Sesiunea anuală de comunicări ştiinţifice, ICEBIOL, aprilie 1976.
14. M. Zamfir-Grigorescu, S. Vasu, St. cerc. biochim., **21**, *1*, 107 (1978).
15. S. Vasu, teză de doctorat, Bucureşti, 1973.
16. G. L. Miller, R. Blum, W. E. Glennon, A. L. Barton, Anal. Biochem., **1**, 127 (1960).
17. M. Lisker, J. Katan, Y. Henis, Canad. J. Microbiol., **21**, 1298 (1975).

REFERAT GENERAL

SINTEZA PROTEINELOR LA EUCARIOTE

DOINA POPOV

Structura mRNA
Ribozomii eucariotelor
Interacţiunile poliribozomi — membrane
Rolul ribozomilor legaţi de membrane în sinteza proteinelor secretorii
Sinteza proteinelor membranare integrale
Mecanismul sintezei proteinelor la eucariote :
— etapa de iniţiere
— etapa de elongare
— terminarea sintezei
Posibilităţi de investigare a sintezei proteice la eucariote:
— studii *in vivo*
— studii *in vitro*
Concluzii şi perspective

Cercetările efectuate în ultimul deceniu au dus la elucidarea în detaliu a desfăşurării sintezei proteice în celulele procariotelor, deşi unele etape ale acestui proces sînt încă controversate. În celulele eucariotelor, etapa de transcripţie, realizată în nucleu, şi cea de translaţie, efectuată în citoplasmă, sînt net separate spaţiotemporar (1). În primele etape ale dezvoltării s-a evidenţiat chiar desfăşurarea independentă a translaţiei faţă de transcripţie.

Structura mRNA

La eucariote, mRNA se găseşte sub formă de complexe ribonucleoproteice libere sau asociate cu ribozomii în polizomi. În alcătuirea complexelor ribonucleoproteice ale polizomilor s-a identificat prezenţa a două proteine, de greutăţi moleculare cuprinse între 49000 şi 52000 şi, respectiv, 73000 şi 78000. Ultima este ataşată în regiunea cuprinzînd secvenţe poli (A) ale mRNA (2). În celule HeLa şi în fibroblaste s-a evidenţiat existenţa unor segmente de poli (A), alcătuite din 150—200 de nucleotide şi localizate de asemenea spre capătul 3′ al mRNA.

Cercetările efectuate au arătat că segmentele de poli (A) sînt ataşate de membranele reticulului endoplasmatic (RE). Îndepărtarea a 85% din ribozomi în prezenţa EDTA nu disociază poli (A) de membrane, acestea rămînînd asociate în proporţie de 40—60%. Digestia ulterioară a RNA cu ribonuclează pancreatică (3), acţiunea unor concentraţii crescute de KCl, a puromicinei şi verucarinei A (4) lasă intactă legătura dintre fragmentele de poli (A) şi membranele RE. Excepţie face segmentul de poli (A) al mRNA ce codifică imunoglobulinele în celulele mielomatoase, la care

St. cerc. biochim., 23, 2, 217—231 (1980)

tratarea cu puromicină și concentrații ridicate de KCl disociază fragmentul de poli (A) de membranele RE (5). Se pare deci că legarea mRNA de membrane este o caracteristică generală a RE rugos, dar tăria acestei legături diferă în funcție de sistemul cercetat. Funcția biologică a legăturii mRNA de RE pare a fi cea de a asigura în cursul translației vecinătatea centrilor de legare a ribozomilor și de a ușura reutilizarea mesagerului în cazuri de reinițieri (6).

Cu privire la rolul segmentelor de poli (A) în molecula de mRNA s-au emis mai multe ipoteze (7):

1. Segmentele de poli (A) participă în transferul mRNA de la nucleu la citoplasmă. Această ipoteză nu pare a fi însă valabilă, întrucît s-au evidențiat mRNA specifici pentru histone, care, deși nu conțin astfel de segmente, sînt totuși transportați de la nucleu la citoplasmă.

2. Segmentul de poli (A) asigură stabilitatea structurii mRNA. Această ipoteză este susținută de următoarele date experimentale:

— Acei mRNA din care s-a îndepărtat secvența de poli (A) din capătul 3′ al moleculei sînt mult mai degradabili comparativ cu moleculele adenilate.

— Capacitatea translațională a mRNA lipsit de poli (A) este foarte redusă și în timp se diminuează cu rapiditate.

— Îndepărtarea segmentelor de poli (A) crește susceptibilitatea moleculei la degradarea de către RN-aza hepatică. Moleculele de mRNA care prezintă secvențe de poli (A) la capătul 3′ sînt mult mai stabile față de acțiunea RN-azei. De aceea s-a presupus că secvențele de poli (A) ar acționa ca inhibitori ai endonucleazelor. O dovadă în acest sens este faptul că mRNA al procariotelor, cu secvențe de poli (A) scurte, este mult mai susceptibil la atacul endonucleazelor, comparativ cu cel al eucariotelor, cu secvențe poli (A) mai lungi.

3. Segmentul de poli (A) influențează însuși metabolismul mRNA. Sub acțiunea exonucleazelor, lanțurile de poli (A) se scurtează progresiv, crescînd viteza de degradare a părții neadenilate a moleculei.

O altă particularitate a structurii speciilor de mRNA la eucariote o constituie metilarea capătului 5′ al moleculei. Astfel, mRNA din celulele L de șoarece (8), precum și cel din celulele BSC —1 de maimuță (9) cuprind la capătul 5′ terminal următoarea structură: m^7 GpppN^m, unde N^m = A^m, U^m, G^m și C^m. În cazul celulelor HeLa, mRNA prezintă două tipuri de grupări 5′ terminale: m^7 G(5′)ppp(5′) și m^7 G(5′)ppp(5′)N^m — N^m (10). Modelul general al alcătuirii mRNA al celulelor eucariote poate fi deci considerat următorul (11 a):

$$m^7G(5')ppp(5')N^m(N^m)N\,|\!\!-\!\!-\!\!-

desfășurarea procesului de sinteză proteică. S-a constatat astfel că adaosul de grupări metil la un mRNA nemetilat stimulează puternic procesele de sinteză proteică, pe cînd îndepărtarea acestei grupări prin β-eliminare are ca efect scăderea eficienței translației. Se pare deci că prezența grupării 5′ terminale m^7G este deosebit de importantă pentru legarea eficientă a mRNA de ribozomi.

Un alt aspect al rolului moleculelor de mRNA în sinteza proteinelor eucariotelor îl constituie influența structurii secundare și terțiare a acestuia asupra desfășurării translației. Această concluzie a rezultat din cercetarea iregularităților de frecvență a desfășurării translației, proces considerat pînă nu demult ca decurgînd cu o frecvență constantă (13).

Ribozomii eucariotelor

La pro- și eucariote, sinteza proteică se desfășoară după un mecanism similar, procesul evolutiv reflectîndu-se prin compozițiile deosebite ale proteinelor ribozomale și solubile (14). Ribozomii eucariotelor sînt considerabil mai mari și complecși în ceea ce privește compoziția în proteine, comparativ cu cei ai procariotelor. Imaginile de microscopie electronică ale citoplasmei celulelor eucariote evidențiază prezența ribozomilor ca structuri de dimensiuni uniforme, cuprinse între 120 și 150 Å (15). Aceștia apar fie liberi — aranjați în șiruri, în rozete, în structuri elicoidale sau sub formă de grile —, fie legați de RE rugos. La o mărire mai mare, ribozomii prezintă adesea o substructură fenestrată.

Granulele ribozomale evidențiate morfologic corespund probabil ribozomilor funcționali din punct de vedere biochimic (16), fiecare cuprinzînd un fragment de RNA ribozomal 45 S, cu o greutate moleculară de $4{,}7 \times 10^{-6}$ daltoni și o lungime de 4,5 μ.

Cercetarea ultrastructurii celulelor epiteliale uterine, după administrare de estradiol, a condus la rezultate interesante asupra structurii fine a poliribozomilor (15). În aceste preparate, ribozomii apar ca îngroșări ale rețelei ribonucleoproteice, rețea care acoperă întreaga suprafață celulară cuprinsă între nucleu și membrana plasmatică. Fibrilele componente ale acestei rețele au grosimi de aproximativ 100 Å, iar în regiunile în care sînt pliate sub formă de „granule" ribozomale grosimea lor poate ajunge pînă la 300 Å. Fiecare fibrilă pare a fi alcătuită din două filamente elementare cu grosimi de 10—40 Å. Imaginile de microscopie electronică evidențiază în plus continuitatea filamentelor ribozomale cu fibrilele fine ale citoplasmei, ceea ce poate constitui o dovadă — la nivel morfologic — de eliberare a lanțurilor polipeptidice direct în citoplasmă, așa cum a fost demonstrat în cazul albuminei (17).

Din punct de vedere funcțional, citoplasma celulelor eucariote cuprinde două tipuri de polizomi (18):

— Polizomi liberi, care eliberează polipeptidele sintetizate în faza solubilă a citoplasmei. La nivelul lor se sintetizează 60% din proteinele ficatului de șobolan (19).

— Polizomi legați de membranele RE, care eliberează vectorial (direcționat) polipeptidele sintetizate, fie în membranele RE, fie prin acestea în lumenul cisternelor RE. Gradul de atașare a ribozomilor de RE poate fi însă diferit. La nivelul lor se sintetizează 40% din proteinele

țesutului hepatic. Dimensiunea medie a proteinelor sintetizate de polizomii legați este mai mică comparativ cu cea a proteinelor sintetizate de polizomii liberi (19).

În condiții fiziologice se păstrează o anumită proporție — specifică de țesut — între polizomii liberi și cei legați de RE. Această proporție este însă modificată de variații diurne (20), de etapele de diferențiere celulară (21) și de compoziția mediului de omogenizare și fracționare utilizat (22).

În plus, există posibilitatea unor schimburi de subunități între ribozomii legați, după efectuarea unui ciclu de translație, și cei liberi (23).

În celulele de drojdie cu creștere rapidă s-au pus în evidență ribozomi atașați suprafeței externe a mitocondriilor (24), care eliberează produșii de sinteză vectorial în membranele mitocondriale sau traversîndu-le în însuși spațiul matriceal. S-a semnalat totodată prezența unor ribozomi în interiorul mitocondriilor (25) și al cloroplastelor (26).

Din punctul de vedere al dimensiunilor, polizomii citoplasmatici ai eucariotelor sînt mai mari (coeficient de sedimentare 80 S) decît cei ai procariotelor (coeficient de sedimentare 70 S), în timp ce ribozomii cloroplastelor și mitocondriilor au aproximativ aceleași dimensiuni cu ribozomii procariotelor (bacterii și alge albastre-verzi) (27).

Toți ribozomii sînt alcătuiți din două subunități de dimensiuni inegale : în cazul ribozomilor 80 S, subunitățile sedimentează la 40 S și 60 S, iar în cazul ribozomilor 70 S, acestea sedimentează la 30 S și 50 S. Este bine cunoscut faptul că sinteza proteică are loc numai atunci cînd cele două subunități sînt asociate una cu cealaltă și combinate cu mRNA. O anumită proporție de subunități ribozomale se găsește însă liberă în citoplasma solubilă (11 b).

Analog ribozomilor procariotelor, cei ai eucariotelor sînt alcătuiți din rRNA și proteine ribozomale.

Studiul rRNA-ului eucariotelor s-a efectuat în special pe preparate obținute din celule în cultură, expuse unor medii cuprinzînd ^{3}H-metilmetionină sau ^{3}H-uridină (28). Cu ajutorul acestor modele s-a urmărit comparativ procesul de sinteză și cel de degradare a ribozomilor celulelor provenite din țesuturi în creștere, în comparație cu celule canceroase transplantabile, la care nu se întîlnește un metabolism al rRNA.

În celulele normale au loc cel puțin trei tipuri de scindări ale rRNA-ului, și anume în porțiuni ale moleculei care nu sînt stabilizate prin structuri secundare, în porțiuni stabilizate prin astfel de structuri și în regiunea 3′ a subunității 18 S. Ultima dintre acestea conduce la distrugerea structurii ribozomilor și la obținerea unor fragmente de rRNA. Primele două tipuri de scindări se manifestă la subunitatea 28 S și nu alterează capacitatea ribozomilor de a funcționa în sinteza proteică.

O altă proprietate distinctă a subunității ribozomale 18 S este conservatismul ei — în privința greutății moleculare și secvenței — în cursul evoluției eucariotelor, spre deosebire de subunitatea 28 S (29).

Proteinele ribozomale ale eucariotelor manifestă de asemenea un caracter conservativ în cursul evoluției, deși s-au identificat și proteine caracteristice speciilor. Astfel, electroforeza bidimensională a proteinelor ribozomale obținute din ficat de pui și șobolan a relevat prezența în ficatul

de pui a 7 proteine, semnificativ diferite în subunitatea 18 S, și a 17 proteine specispecifice în subunitatea 28 S (29).

Cercetarea conservatismului structurii ribozomilor în cursul evoluției a fost posibilă prin utilizarea următoarelor metode (27):

— Realizarea de anticorpi față de proteinele ribozomale ale unor reprezentanți ai bacteriilor, plantelor și mamiferelor, testîndu-se apoi reactivitatea lor față de proteinele speciilor heterologe. Pe această cale s-a constatat că ribozomii procariotelor reacționează puternic între ei, dar prezintă o reactivitate antigenică scăzută față de ribozomii eucariotelor.

— Electroforeza bidimensională în gel de poliacrilamidă a evidențiat mobilități similare ale proteinelor ribozomale de la mamifere, păsări și reptile.

— Unii ribozomi hibrizi din subunitățile ribozomale de *E. coli* și din cloroplaste de spanac sau din subunități provenite din semințe de mazăre și țesut hepatic de șoarece s-au dovedit a fi funcționali, sintetizînd lanțuri peptidice.

Metodele menționate, la care s-a adăugat în ultimii ani cercetarea secvenței de aminoacizi a proteinelor ribozomale provenite de la întreaga diversitate a organismelor vii, au arătat că structura proteinelor ribozomale s-a modificat mult în cursul evoluției, astfel încît există foarte puțină homologie între ribozomii pro- și eucariotelor. Cu toate acestea, funcția de biosinteză proteică a ribozomilor a rămas aceeași în cursul evoluției.

Interacțiunile poliribozomi—membrane

Datele biochimice (30) și cele ultrastructurale (30), (31) au precizat atașarea poliribozomilor de membranele RE, prin intermediul subunității 60 S. Cercetările ultimilor ani au confirmat acest tip de legare, stabilind următoarele puncte de atașare a ribozomilor de RE (23):

a. Prin intermediul subunității 60 S, forța de legare fiind de natură electrostatică. Tratarea suspensiilor de microzomi hepatici cu concentrații crescătoare de EDTA determină detașarea selectivă a subunităților ribozomale mici. La concentrații ridicate de EDTA se desprind toate subunitățile ribozomale 40 S, precum și unele dintre subunitățile 60 S (30). KCl în concentrație de 500 mM detașează de asemenea ribozomii de membrane, eliberînd cantități echimoleculare de subunități 40 S și 60 S (32), care își mențin activitatea biologică.

b. Prin intermediul lanțului peptidic nou format. În primele etape ale elongării, lanțul peptidic nou format este încă scurt și nu contribuie la atașarea ribozomilor de RE; în această etapă, ribozomii pot fi însă ușor detașați prin tratarea cu RN-ază. Cînd lanțul peptidic a devenit suficient de lung, el fixează ferm ribozomii de RE, disocierea fiind posibilă numai în prezența unor amestecuri ce conțin concentrații saline ridicate, ioni de Mg^{2+} și puromicină 1 mM (33).

c. Prin intermediul unor regiuni din capătul 3′ al mRNA legate direct de proteinele RE (23).

Alți factori implicați în legarea ribozomilor de membranele RE sînt: prezența steroizilor (34) și a resturilor de acid sialic, care mediază inter-

acțiunile ionice dintre ribozomi și RE ; colesterolul și aflatoxina B_1, care degranulează fracțiunile de RE rugos, detașînd ribozomii de acestea (21).

În desfășurarea practică a experimentelor de sinteză *in vitro* se pune adesea problema eliberării ribozomilor legați de membrane în condiții experimentale care să împiedice accesul nucleazelor ce ar putea degrada polizomii (35). S-a arătat astfel că tratarea polizomilor cu DOC determină o eliberare nespecifică a monoribozomilor din polizomi, proces blocat însă în prezența Tritonului X—100. Cicloheximida, deși inhibă selectiv etapa de elongare a lanțurilor peptidice, nu influențează etapa de inițiere și determină o separare selectivă de polizomi, scăzînd procentul de monozomi.

Rolul ribozomilor legați de membrane în sinteza proteinelor secretorii

Celulele eucariote cuprind poliribozomi liberi și legați de RE, cu o preponderență a acestora din urmă în țesuturile în care se sintetizează proteine de „export" („secretorii"). Pornind de la această observație s-a postulat că polizomii legați de membrane ar fi responsabili de sinteza proteinelor secretate, iar la nivelul poliribozomilor liberi s-ar sintetiza preferențial proteinele destinate utilizării în spațiul intracelular.

Procesul de sinteză a proteinelor secretorii poate fi considerat ca desfășurîndu-se în etape care au însă un pronunțat caracter de continuitate (36).

O primă etapă este cea de translare a mRNA la nivelul polizomilor liberi, sintetizîndu-se lanțuri peptidice care cuprind 30—40 de aminoacizi (21).

A doua etapă este cea de sinteză și de segregare a proteinelor secretorii în spațiul cisternic al RE rugos. Am arătat mai înainte posibilitatea atașării ribozomilor de membranele RE prin intermediul subunității 60 S și al lanțului polipeptidic nou format. Se admite astăzi că acest lanț este dispus într-un „canal" al subunității ribozomale mari, protejînd astfel cei 30—40 de aminoacizi din regiunea sa C-terminală față de atacul proteazelor (37). Sabatini și Blobel au propus un model după care acest canal s-ar continua cu un altul în însăși membrana RE, ceea ce permite ca, după elongarea lanțului peptidic, acesta să se elibereze direct în spațiul cisternic (38), (39).

Mecanismul care determină procesul s-a denumit „eliberare vectorială (direcționată)" a polipeptidelor sintetizate. Conform ipotezei „semnal" (32), (40), mRNA-ul proteinelor secretorii conține spre capătul 3′ al codonului de inițiere AUG o anumită secvență de „codoni-semnal", care sintetizează o „peptidă-semnal". Pe măsura elongării, aceasta iese din subunitatea ribozomală 60 S și atașează ribozomii de membranele RE. Totodată, această peptidă determină asocierea proteinelor receptoare ale ribozomilor, care formează astfel un canal prin membrană. În forma lor asociată, proteinele receptoare interacționează cu anumiți centri ai subunității 60 S, avînd ca efect legarea canalului subunității 60 S de cel format prin membrană.

În fracțiunea de RE rugos s-a identificat prezența a două glicoproteine, de greutate moleculară 65 000 (riboforina I) și 63 000 (riboforina II), care par a fi responsabile de legarea ribozomilor de membranele RE. Ele

au mobilităţi electroforetice similare în glandele lacrimare şi în ficatul de şobolan (41).

Peptida-semnal conţine 15—20 de resturi de aminoacizi în regiunea N-terminală şi are un caracter hidrofob. Proporţia de leucină în peptidele-semnal este în general de 24,4% comparativ cu 12%, cît reprezintă acest

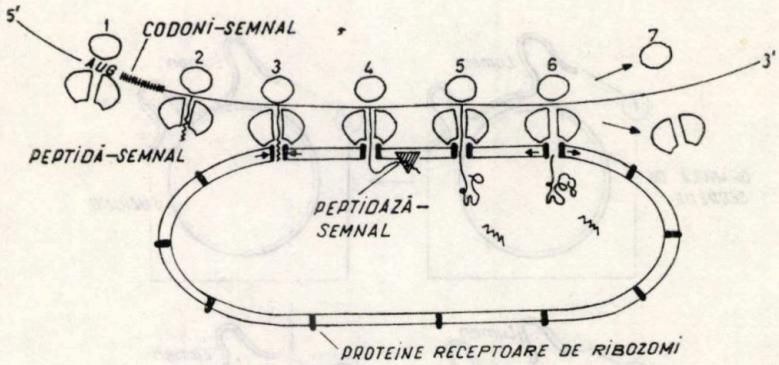


Fig. 1. — Ilustrarea schematică a ipotezei „semnal" (după (39)).

aminoacid în proteinele ţesutului hepatic. În regiunea N-terminală există un rest de metionină, iar în cea C-terminală a acestor peptide (cu excepţia peptidelor-semnal ale imunoglobulinelor) glicină (42).

Cînd peptida-semnal, denumită şi proteină *pre*secretorie (39), a trecut în lumenul cisternelor RE, intervine o „peptidază-semnal", care o scindează de lanţul peptidic în creştere. Lanţul peptidic continuă apoi să crească pînă la terminarea sintezei, după care va fi eliminat sub formă de „*pro*proteină", care nu este încă pliată şi este deci susceptibilă la degradări.

Ribozomii se desprind de membranele RE, se disociază proteinele receptoare de ribozomi, canalul se elimină şi se reface situaţia iniţială, în care ciclul poate fi reluat.

În *pro*proteina nou formată se constituie punţi S—S, ceea ce transformă peptidele liniare în molecule globulare cu diametrul mai mare sau cel mult egal cu 20 Å, şi se produc adăugări de zaharuri în regiunea proximală sau în cea centrală (core) a moleculei, sub acţiunea dolicolfosfaţilor transportori de N-acetil-glucozamină, manoză etc. (43). Se constituie astfel structura cuaternară a proteinelor secretorii la nivelul spaţiului cisternic al RE.

Într-o etapă ulterioară, proteinele secretorii se deplasează mai ales prin difuzie către elementele de transport ale RE rugos, localizate la limita dintre acestea şi complexul Golgi (36). Procesele de fuziune şi de fisiune determină eliminarea conţinutului veziculelor transportoare în vacuole condensate. Procesul necesită energie (ATP), realizîndu-se împotriva unui gradient de concentraţie.

La nivelul complexului Golgi au loc completarea lanţurilor oligozaharidice ale proteinelor şi peptidoglicanilor sub acţiunea secvenţială a glicozil-transferazelor membranare (36), încorporarea unor polianioni

(de tipul sulfatului anorganic) în moleculele sintetizate, sortarea proteinelor secretorii și expedierea lor conform destinației finale : export către unele compartimente extracelulare sau eliminarea în compartimentele intracelulare.

Concentrarea proteinelor secretorii se realizează la nivelul vacuolelor condensate, care, pe măsură ce se umplu, se transformă în granule mature

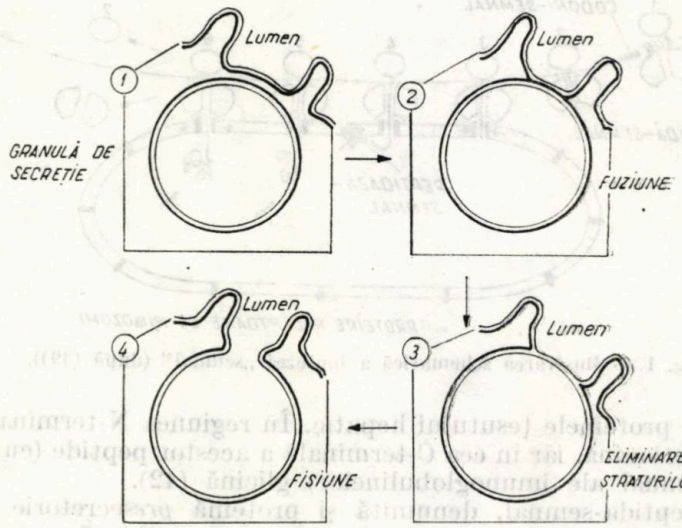


Fig. 2. — Reprezentarea schematică a exocitării granulelor secretoare (după (36)) :

1 și *2*, granula se deplasează de la locul depozitării spre regiunea apicală a celulelor în imediata vecinătate a lumenului; *3*, fuziunea membranei granulei secretoare cu plasmalema luminală; *4*, fisiunea membranelor și formarea unui orificiu prin care are loc eliminarea conținutului granulei de secreție.

de secreție (granule de zimogen) (36). Acestea se depozitează în spațiul intracelular, exocitarea (fig. 2) realizîndu-se sub influența unor hormoni sau a unor substanțe neurotransmițătoare.

Multitudinea proceselor enumerate evidențiază următoarele caracteristici generale ale sintezei și transportului proteinelor secretorii (36) :

— procesul are loc vectorial spre zona apicală a celulelor exocrine, fiind ireversibil și discontinuu din punct de vedere funcțional ;

— în timpul sintezei și al transportului proteinelor secretorii au loc interacțiuni specifice membrană—membrană și chiar deplasări de membrane între compartimentele intracelulare.

Sinteza proteinelor membranare integrale

Deși problema biosintezei proteinelor membranare este încă controversată, se admite (44) că membranele nu sînt formate *de novo*, ci se alcătuiesc în urma sintezei de lipide și a inserării de proteine integrale în fragmente de membrane preexistente, care servesc ca matrițe. Astfel,

proteinele parțial ancorate pe fața „trans" a membranei (fig. 3, *a*), de tipul unor receptori ai limfocitelor B (44), sînt sintetizate, probabil, printr-un mecanism de tip secretoriu, după care se ancorează în membrană.

Proteinele cu dispoziție transmembranară (fig. 3, *b*) de tipul glicoforinei (45) sînt sintetizate și inserate în membrane printr-un mecanism analog cu sinteza și dispunerea proteinelor secretorii. Într-o primă etapă

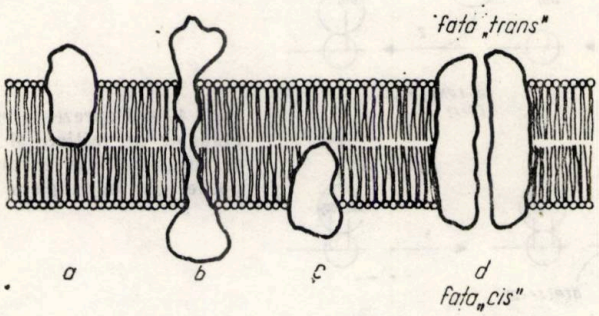


Fig. 3. — Reprezentarea schematică a dispunerii proteinelor integrale în membrane. Fața „cis" a membranei este considerată acea parte a membranei RE de care sînt atașați ribozomii.

a, Proteine parțial ancorate pe fața „trans"; *b*, proteine transmembranare; *c*, proteine parțial ancorate pe fața „cis"; *d*, proteine de transport (după (44)).

se formează o porțiune hidrofilă a lanțului peptidic, care traversează membrana celulară. Aceasta este urmată de o secvență hidrofobă, care va rămîne ancorată în stratul lipidic al membranei. Următoarea secvență hidrofilă sintetizată va fi reținută pe fața „cis" a membranei. După eliberarea lanțului, cele două secvențe hidrofile se pliază independent una de cealaltă la nivelul fețelor „cis" și, respectiv, „trans".

Proteinele membranare parțial ancorate pe fața „cis" a membranei (fig. 3, *c*) sînt sintetizate de ribozomii liberi (44), (46), de cei legați (47) sau de ambele tipuri de ribozomi. Astfel, citocromul b_5 este sintetizat numai de polizomii legați, iar NADPH-citocrom c-reductaza microzomală este sintetizată la nivelul ambelor tipuri de ribozomi (47).

După sinteză, proteinele sînt eliminate în citoplasmă și se alipesc de fața „cis" a membranei. În cursul translației, capătul N-terminal rămîne în faza solubilă a citoplasmei, iar inserarea în stratul dublu lipidic se produce la nivelul capătului C-terminal.

Se admite că proteinele transportoare (fig. 3, *d*), de tipul ATP-azei dependente de Na^+ și K^+ (48), se sintetizează în urma dimerizării spontane a proteinelor ancorate pe fața „cis", proces care are drept consecință formarea unui canal prin membrană.

Modificările posttranslaționale pe care le suferă proteinele membranare constau în glicozilări la nivelul proteinelor ancorate pe fața „trans", acilări ale resturilor polare și ionice și transpeptidări produse în special pe fața „cis". Aceste modificări fixează mai adînc proteinele integrale de membrane, dispunîndu-le în una din situațiile prezentate în figura 3.

Mecanismul sintezei proteinelor la eucariote

Etapele acestui proces sînt următoarele:

Etapa de inițiere (fig. 4, reacțiile 1 și 2) conduce la formarea complexelor de inițiere 40 S și 80 S. În celulele eucariote, reacția de inițiere se desfășoară sub acțiunea unor „factori" proteici izolați și caracterizați

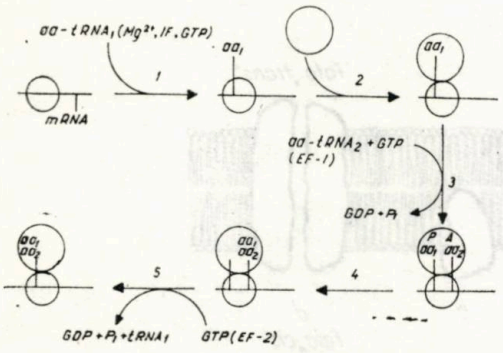


Fig. 4. — Reprezentarea schematică a etapelor de inițiere și elongare la pro- și eucariote. La eucariote, mRNA se poate lega în etapa a 2-a (după (14)).

Fig. 4

din punct de vedere biochimic din reticulocitele de iepure (1). Dintre aceștia, factorul eIF-1 stimulează formarea complexelor: Met-tRNA$_f$·40 S și mRNA·Met-tRNA·40 S, iar eIF-2 participă la formarea complexului ternar: Met-tRNA$_i$·eIF-2·GTP. Acest complex interacționează cu subunitatea ribozomală 40 S, formînd complexul de inițiere 40 S (fig. 5).

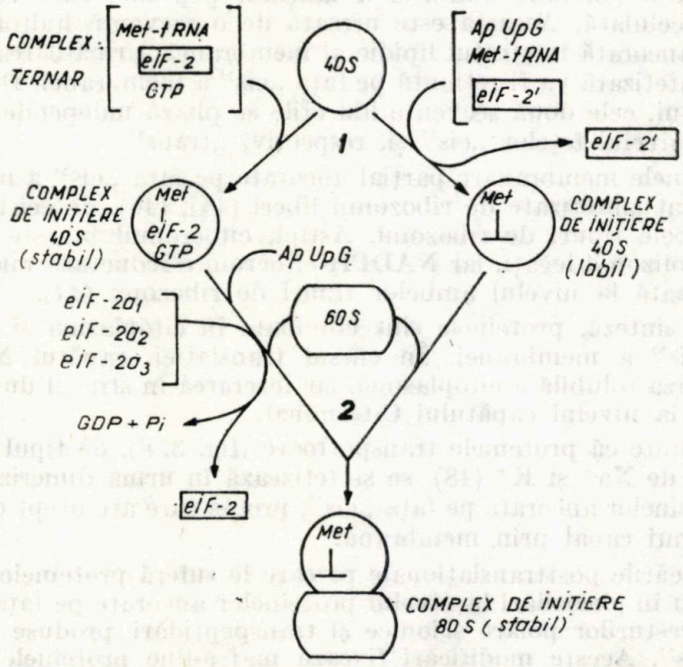


Fig. 5. — Două căi de sinteză ale complexului de inițiere la eucariote, folosind AUG ca matriță (după (14)).

Factorul eIF-2 este specific legării Met-tRNA$_i$ al celulelor eucariote. Din soluţii concentrate, el s-a izolat sub formă de dimer cu greutatea moleculară 180 000, iar din soluţii diluate sub formă de monomer (14). Unirea complexului de iniţiere cu subunitatea ribozomală 60 S are loc sub acţiunea unor „factori suplimentari (accesorii)", a mRNA şi cu aportul energetic al GTP, avînd ca urmare constituirea complexului de iniţiere 80 S (fig. 5).

O altă cale de formare a complexelor de iniţiere 40 S şi 80 S este cea care necesită prezenţa Met-tRNA$_i$, a subunităţilor ribozomale, izolate din *Artemia salina* (49) şi a factorului eIF-2 (fig. 5). Reacţia se desfăşoară mai ales la concentraţii scăzute de ioni de Mg^{2+} (49).

În general, procesul de iniţiere a sintezei proteinelor în celulele eucariote este controlat de concentraţia nucleotidelor, de prezenţa unor hidrolaze şi de influenţa antibioticelor. Astfel, acidul aurintricarboxilic inhibă formarea complexului ternar cu eIF-2, edeina interferă în etapa legării mRNA de ribozomi, iar pactamicina împiedică conversia complexului de iniţiere 40 S în complexul 80 S.

Etapa de elongare începe cu reacţia 3 din figura 4, în care se produce legarea a a-tRNA la situsul ribozomal A, sub acţiunea factorului de elongare EF-1. Se formează complexe ternare de tipul aa-tRNA·EF-1·GTP. Formarea noii legături peptidice se realizează sub acţiunea unei peptidiltransferaze (fig. 4, reacţia 4), pentru ca în reacţia 5 factorul de elongare EF-2 să catalizeze deplasarea mRNA de-a lungul ribozomului, fenomen care se produce concomitent cu mutarea peptidil-tRNA în situsul P. Ribozomii rezultaţi au astfel situsul A liber, putînd accepta un nou aa-tRNA într-un nou ciclu de elongare cu intervenţia factorului EF-1.

Terminarea sintezei are loc sub acţiunea unui factor de eliminare a lanţului peptidic (RF), care se leagă la situsul A al ribozomului, cînd în dreptul acestuia a ajuns unul din codonii nonsens UAA, UGA, UAG ai mRNA (50), (51 a). Se activează o peptidil-transferază, care detaşează peptida legată de tRNA la situsul P. Disocierea de ribozom a factorului de eliminare necesită energie, care provine din hidroliza unei molecule de GTP (14) (fig. 4).

Desfăşurarea sintezei proteice la eucariote este influenţată de asigurarea unui raport optim între ribozomii liberi şi cei legaţi, raport dependent de compoziţia mediilor de omogenizare folosite (21), de starea de nutriţie a animalelor, de influenţe hormonale (34) şi de prezenţa unor inhibitori (51 b).

Posibilităţi de investigare a sintezei proteice la eucariote

Studii in vivo. În aceste cercetări se injectează animalele cu aminoacizi marcaţi (^{3}H-leucină) şi se urmăreşte intervalul de timp al încorporării de radioactivitate în lanţurile peptidice nou formate, la nivelul polizomilor liberi sau al celor legaţi de RE. Metoda s-a aplicat pentru investigarea sintezei atît a unor proteine membranare (NADPH—citocrom c—reductaza şi citocromul b_5) (47), cît şi a celor secretorii (52).

Prin experimente *in vivo* s-a demonstrat de asemenea sinteza citocromului P-450 la nivelul fracţiunii de poliribozomi legaţi ai RE din ţesutul hepatic (53).

În cazul β-glucuronidazei hepatice, injectarea șobolanilor cu ^{3}H-leucină determină o încorporare maximă de radioactivitate la 9 ore de la injectare la nivelul enzimei microzomale. După acest interval scade radioactivitatea fracțiunii microzomale a enzimei, crescînd corespunzător cea a fracțiunii lizozomale. Pe aceste baze s-a sugerat existența unei căi de transport al β-glucuronidazei nou sintetizate de la RE la lizozomi, trecînd probabil prin complexul Golgi (52).

Studii in vitro. Realizarea sintezei *in vitro* a proteinelor eucariotelor a constituit una din preocupările esențiale ale biologiei celulare din ultimul deceniu. S-a reușit astfel sinteza în sisteme acelulare a actinei (54), feritinei (55), imunoglobulinelor (56), (57), mioglobinei (58), ovalbuminei (59), (60), albuminei (42), a unor proteine ribozomale (61) etc. Pentru desfășurarea sintezei proteice *in vitro* sînt necesari polizomi liberi sau atașați de RE, un amestec din cei 20 de aminoacizi esențiali dintre care unul marcat (^{35}S-metionină sau ^{3}H-leucină), un sistem enzimatic generator de energie, ioni de Mg^{2+} și K^+, precum și adaosul unor extracte acelulare care cuprind factorii de inițiere și de elongare necesari sintezei, tRNA etc.

Compoziția unui sistem acelular pentru cercetarea sintezei proteice *in vitro* este următoarea :

Componenți	*Concentrație*
extract celular (celule animale, germeni de grîu)	5 mg/ml
tampon Tris-HCl	20 mM
$MgCl_2$	1—5 mM
KCl	60—120 mM
ATP	1 mM
GTP	0,1 mM
creatin-fosfat	5 mM
creatin-fosfokinază	5 μg/ml
β-mercaptoetanol	5 mM
aminoacizi esențiali (cu excepția celui marcat)	50 μM
aminoacid marcat	10—120 μC_i/ml
mRNA	20—200 μg/ml
Volum total : 25 μl-1 ml	

Reacția se desfășoară timp de 10—180 de minute la 20—37°C, prelevîndu-se la intervale regulate de timp probe în care se estimează încorporarea de radioactivitate prin scintilație în lichid.

Polizomii utilizați preponderent în astfel de studii au fost obținuți din țesut hepatic (19), (47), (62), din reticulocite (60) și din celule tumorale ascitice (63). Tendința cercetărilor actuale este însă aceea de a folosi, în loc de polizomi, mRNA-ul acestora. S-au descris astfel translații *in vitro* pe mRNA obținut din pancreas de bovină (64), ficat de șobolan (65), celule eritroide ale splinei (66), reticulocite de iepure (62) etc.

Concentrația ionilor de Mg^{2+} și K^+ din mediu este unul din factorii deosebit de importanți pentru reușita translațiilor. Se recomandă în general utilizarea unor concentrații de ioni de Mg^{2+} de 1—5 mM și de ioni de K^+ de 60—120 mM (11 c).

Sistemul generator de energie este fie fosfoenolpiruvat — piruvatkinază (70), fie fosfocreatină — creatinfosfokinază (11 c), (51).

Factorii de inițiere și cei de elongare necesari translațiilor se obțin din extract de germeni de grîu (67), din oocite de broască (68), din ficat de șobolan (69) și din lizatele reticulocitelor de iepure (60), (65). Deși

prezintă avantajul unei activități scăzute a mRNA endogen, extractele de germeni de grîu manifestă capacități diferite de translație de la un preparat la altul, determinînd formarea preponderentă a unor peptide cu greutate moleculară mică, și nu eliberează eficient lanțurile peptidice formate. Unele din aceste dezavantaje sînt valabile și pentru fracțiunea de citoplasmă solubilă din ficat de șobolan, care trece neadsorbită pe o coloană de Sephadex G-100.

Utilizarea extractelor obținute din oocite de broască are dezavantajul unor activități foarte mari ale mRNA endogen.

În momentul de față, sursa cea mai reproductibilă de factori de inițiere și elongare necesari translațiilor o formează lizatele reticulocitelor de iepure. Acestea se obțin prin metoda, devenită clasică, a lui Hunt și Jackson (71), iar tratarea lizatelor cu nuclează din micrococi le face dependente de mRNA exogen (72). Metoda conduce la sinteza unor lanțuri peptidice complet formate, este simplă și ușor de realizat (65).

Într-un studiu recent (73) s-a efectuat sinteza *in vitro* a β-glucuronidazei, utilizîndu-se atît polizomi hepatici legați de RE, cît și polizomi din glandele prepuțiale de șobolan. Ca sursă de factori de inițiere și elongare s-a folosit un lizat din reticulocite de iepure (71). Imunoprecipitarea amestecurilor de translație cu IgG de iepure (antiglucuronidază prepuțială) a dus la evidențierea unei singure benzi radioactive în cazul translației pe polizomi hepatici legați, avînd aceeași mobilitate electroforetică cu enzima matură purificată (74). În experimentele de translație efectuate pe polizomi din glandele menționate s-au evidențiat prin imunoprecipitare doi produși de sinteză *in vitro*, cu mobilități electroforetice puțin diferite la unul față de celălalt.

Posibilitatea de realizare a sintezelor de proteine *in vitro* este influențată de (21):

1) modul de obținere și capacitatea translațională a mRNA;

2) durata ultracentrifugării, care poate constitui o etapă critică, determinînd peroxidarea lipidelor membranare și degradarea mRNA;

3) integritatea moleculei de mRNA, utilizîndu-se acele condiții experimentale în care se realizează o inhibare de 90—99% a RN-azei neutre din fracțiunea microzomală.

Concluzii și perspective

Cercetarea sintezei proteice la eucariote reprezintă unul dintre domeniile de vîrf ale biologiei celulare actuale, domeniu cu descoperiri certe, dar încă cu multe necunoscute.

Date experimentale recente (23) au arătat că informația necesară direcționării corecte a lanțurilor polipeptidice prin membranele RE este codificată în înseși moleculele de mRNA. Se pare astfel că secvențele mRNA atașate direct de RE ar contribui la realizarea selecției mesagerilor corespunzători.

O altă direcție de perspectivă o constituie cercetarea rolului subunităților ribozomale 40 S în transportul mRNA de la nucleu la citoplasmă (75).

Sînt încă puțin cunoscute astăzi (60) mecanismele de transport ale polipeptidelor și proteinelor prin membrane, deși astfel de procese au loc în mod curent *in vivo* (în pătrunderea unor peptide toxice în celule, în transportul proteinelor dintr-un compartiment celular în altul, în

exportul proteinelor secretorii). În cazul proteinelor secretorii, ipoteza „semnal" constituie un model adecvat pentru explicarea bazelor moleculare ale transportului proteinelor prin stratul dublu lipidic al RE (39). Nu se cunoaște însă mecanismul de transport al proteinelor nonsecretorii, care sînt sintetizate de asemenea la nivelul RE rugos și transferate prin membrane (23). Dacă proteinele lizozomilor și ale peroxizomilor s-ar sintetiza tot prin mecanisme-„semnal", vor trebui descifrate și procesele ce diferențiază aceste proteine de cele secretorii, cu care coexistă în spațiul cisternic al RE (39).

În sfîrșit, studierea microarhitecturii și funcției protein-enzimelor în membrane (76) poate fi realizată numai în urma stabilirii căilor de biosinteză. Pînă în prezent s-au imaginat numeroase metode pentru abordarea sintezei *in vivo* și *in vitro* a proteinelor, sistemele de lucru fiind într-o continuă evoluție pe măsura perfecționării disponibilităților tehnice.

Prezentat la redacție
la 30 octombrie 1978

Institutul de biologie și patologie celulară, București

BIBLIOGRAFIE

1. M. H. Schreier, B. Erni, T. Staehelin, J. mol. Biol., **116**, 727 (1977).
2. W. J. Van Venrooij, C. A. G. van Eekelen, R. T. Jansen, J. M. G. Princen, Nature, **270**, 189 (1977).
3. C. Milcarek, S. Penman, J. mol. Biol., **89**, 327 (1974).
4. M. Adesnik, J. E. Darnell, J. mol., Biol., **67**, 397 (1972).
5. T. M. Harrison, G. G. Brownlee, C. Milstein, Eur. J. Biochem., **47**, 621 (1974).
6. D. D. Sabatini, G. Kreibich, în *Enzymes of biological membranes*, sub red. A. Martonosi, Plenum Publ. Corp., vol. 2, 1976, p. 531.
7. P. Karpetsky, P. A. Hieter, J. J. Frank, C. C. Levy, Mol. cell. Biochem., **17**, 89 (1977).
8. G. L. Dettman, W. M. Stanley, Jr., Biochim. biophys. Acta, **287**, 124 (1972).
9. M. J. Clemens, R. S. Ranu, D. H. Levin, M. Seidlin, I. M. London, Blood, **44**, 946 (1974).
10. Y. C. Chen, C. L. Woodley, K. K. Bose, N. Gupta, Biochim. Biophys. Res. Commun., **48**, 1 (1972).
11. A. E. Smith, *Protein-Biosynthese*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1977, p. 21 (a); p. 23 (b), p. 9 (c).
12. A. J. Shatkin, A. K. Banerjee, G. W. Both, Y. Furuichi, S. Muthurrishnan, Fed. Proc., **25**, 2214 (1977).
13. G. von Heijne, L. Nilsson, C. Blomberg, J. theor. Biol., **68**, 321 (1977).
14. H. Weissbach, S. Ochoa, Annu. Rev. Biochem., **45**, 1971 (1976).
15. J. Brokelmann, Cell Tiss. Rev., **179**, 531 (1977).
16. G. Palade, J. Biophys. Biochem. Cytol., **1**, 567 (1955).
17. C. Lin, J. Chan, Science, **190**, 465 (1975).
18. D. D. Sabatini, G. Ojakian, M. A. Lande, J. Lewis, W. Mok, M. Adesnik, G. Kreibich, *Advances in experimental medicine and biology*, sub red. R. H. Meints, E. Davies, Plenum Press, New York, vol. 62, 1975, p. 151.
19. J. C. Ramsey, W. J. Steele, Biochem. J., **168**, 1 (1977).
20. L. Dieminger, Z. Naturforsch., **28 c**, 66 (1973).
21. P. R. McIntosh, K. O'Toole, Biochim. biophys. Acta, **457**, 172 (1976).
22. M. A. Lande, M. Adesnik, M. Sumida, Y. Tashiro, D. D. Sabatini, J. Cell Biol., **65**, 513 (1975).
23. G. C. Shore, J. R. Tata, Biochim. biophys. Acta, **472**, 198 (1977).
24. R. E. Kellems, R. A. Butow, J. biol. Chem., **249**, 3304 (1974).
25. Y. Kuriyama, D. J. Luck, J. Cell Biol., **58**, 776 (1973).
26. M. M. Margulies, A. Michales, J. Cell Biol., **65**, 60 (1974).
27. H. G. Wittamann, Eur. J. Biochem., **61**, 1 (1976).
28. J. F. Scott, Exp. Cell Rev., **108**, 207 (1977).

29. H. P. R. Ranjoue, J. Gordon, J. biol. Chem., **252**, 9065 (1977).
30. D. D. Sabatini, Y. Tashiro, G. E. Palade, J. mol. Biol., **19**, 503 (1966).
31. N. T. Florendo, J. Cell Biol., **41**, 335 (1969).
32. G. Blobel, D. D. Sabatini, în *Biomembranes*, sub red. L. A. Manson, Plenum Press, New York, vol. 2, 1971, p. 193.
33. M. R. Adelman, D. D. Sabatini, G. Blobel, J. Cell Biol., **56**, 206 (1973).
34. G. H. Sunshine, D. J. Williams, B. R. Rabin, Nat. New Biol., **230**, 133 (1971).
35. G. Thomas, M. Siegmann, P. D. Bowman, J. Gordon, Exp. Cell Res., **108**, 253 (1977).
36. J. D. Jamieson, G. E. Palade, în *International cell biology*, sub red. B. R. Brinkley, K. R. Porter, Rockefeller University Press, 1977, p. 308.
37. G. Blobel, D. D. Sabatini, J. Cell Biol., **45**, 130 (1970).
38. D. D. Sabatini, G. Blobel, J. Cell Biol., **45**, 146 (1970).
39. G. Blobel, în *International cell biology*, sub red. B. R. Brinkley, K. R. Porter, Rockefeller University Press, 1977, p. 318.
40. G. Blobel, B. Dobberstein, J. Cell Biol., **67**, 835 (1975).
41. R. Grebenau, D. D. Sabatini, G. Kreibich, J. Cell Biol., **75**, 234, MB—961 (1977).
42. G. Schreiber, J. Urban, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **82**, 28 (1978).
43. J. J. Lucas, C. J. Waechter, Mol. cell. Biochem., **11**, 67 (1976).
44. S. J. Singer, J. supramol. Struct., **6**, 313 (1977).
45. M. Tomita, V. T. Marchesi, Proc. nat. Acad. Sci., **72**, 2964 (1975).
46. L. Spatz, P. Strittmater, Proc. nat. Acad. Sci., **68**, 1042 (1971).
47. T. Harano, T. Omura, J. Biochem., **82**, 1541 (1977).
48. J. Kyte, J. biol. Chem., **250**, 7443 (1975).
49. C. Nombela, N. A. Nombela, S. Ochoa, *Limpmann Symposium: energy, biosynthesis and regulation in molecular biology*, sub red. D. Richter, Walter de Gruyter, Berlin — New York, 1974, p. 435.
50. W. P. Tate, C. T. Caskey, Mol. cell. Biochem., **5**, 115 (1974).
51. P. L. Altman, D. D. Katz, *Cell Biology, Biological Handbooks I*, Federation of American Society for Experimental Biology, Bethesda, Maryland, 1976, p. 304 (a) ; p. 299 (b).
52. H. Tsuji, K. Kato, J. Biochem., **82**, 637 (1977).
53. M. Negishi, Y. Fujii, Y. Tashiro, Y. Imai, Biochim. Biophys. Res. Commun., **71**, 1153 (1976).
54. S. M. Heywood, A. Rich, Proc. nat. Acad. Sci., **59**, 590 (1968).
55. C. M. Redman, J. biol. Chem., **244**, 4308 (1969).
56. P. Vassali, Proc. nat. Acad. Sci., **58**, 2117 (1967).
57. K. A. Abraham, T. S. Eikhom, R. M. Dowben, O. Garatun, T. Ieldsto, Eur. J. Biochem., **65**, 79 (1976).
58. S. M. Heywood, M. N. Wagwu, Proc. nat. Acad. Sci., **60**, 229 (1968).
59. R. Palacios, R. T. Schimke, J. biol. Chem., **249**, 1424 (1973).
60. R. D. Palmiter, J. Gagnon, K. A. Walsh, Proc. nat. Acad. Sci., **75**, 94 (1978).
61. J. E. Heady, E. H. McConkey, Biochim. Biophys. Res. Commun., **40**, 30 (1970).
62. M. H. Schreier, T. Staehelin, J. mol. Biol., **73**, 329 (1973).
63. S. H. Reynolds, A. Dasgupta, S. Palmieri, A. Majumdar, N. K. Gupta, Arch. Biochem. Biophys., **184**, 328 (1977).
64. P. T. Lomedico, S. J. Chan, D. F. Steiner, G. F. Saunders, J. biol. Chem., **252**, 7971 (1977).
65. M. Diesterhaft, T. Nobuchi, J. Hargrove, C. Thornton, D. Granner, Biochem. Biophys. Res. Commun., **79**, 1015 (1977).
66. C. G. Merkel, S. P. Kwan, J. B. Lingrel, J. biol. Chem., **250**, 3725 (1975).
67. B. E. Roberts, B. M. Paterson, Proc. nat. Acad. Sci., **70**, 2330 (1973).
68. J. M. Nickol, K. L. Lee, T. G. Hollinger, F. T. Kenney, Biochim. Biophys. Res. Commun., **72**, 687 (1976).
69. M. Negishi, D. D. Sabatini, G. Kreibich, J. Cell Biol., **75**, 235, MB—962 (1977).
70. A. K. Falvey, T. Staehlin, J. mol. Biol., **53**, 1 (1970).
71. T. Hunt, R. J. Jackson, *Modern trends in human leukaemia*, J. F. Lehmanns Verlag, Munich, 1974, p. 300.
72. H. R. B. Pelham, R. J. Jackson, Eur. J. Biochem., **67**, 247 (1976).
73. D. Popov, L. Alterman, D. D. Sabatini, G. Kreibich, J. Cell Biol., **79**, 364 a, RP—2308 (1978).
74. M. Himeno, H. Ohhara, Y. Arakawa, K. Kato, J. Biochem., **77**, 427 (1975).
75. A. Lima de Faria, *Handbook of molecular cytology*, North Holland, Amsterdam, 1975, p. 1079.
76. J. W. de Pierre, L. Ernster, Annu. Rev. Biochem., **46**, 201 (1977).

RECENZII

H.-J. GOETZE, K. VETTER, M. ZOBEL, *Diätberechnung für Diabetiker und Übergewichtige* (Calculul dietei pentru diabetici şi supraponderali), VEB-Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1978.

Lucrarea este destinată executării unor calcule rapide pentru alimentaţia diabeticilor şi a celor supraponderali. În acest scop, alimentele, foarte diverse de altfel, au fost ordonate în două nomograme. În aceste nomograme, fiecărui aliment îi corespunde (la 100 g) un anumit număr de calorii, exprimate convenţional (calorii-hidrat de carbon), iar pentru acelaşi aliment sînt prezentate greutăţile zaharurilor, grăsimilor şi altor componente.

Nomogramele sînt însoţite de un text explicativ cu ajutorul căruia cei interesaţi pot deprinde, prin intermediul exemplelor, regulile folosirii corecte. Lucrarea este simplă şi ingenioasă, putînd fi folosită de oricare cititor. Ea prezintă un mare interes practic pentru cei suferinzi de diabet şi pentru cei a căror greutate corporală depăşeşte mult cifra normală.

Cea mai interesantă categorie de specialişti o reprezintă, în mod evident, nutriţioniştii, pentru care valorile prezentate constituie numai în principiu vechi cunoştinţe, deoarece în fapt cifrele sînt rezultatul unor determinări exacte şi de multe ori diferite de cele cunoscute.

Mihai Zamfir

Current topics in microbiology and immunology (Probleme actuale în microbiologie şi imunologie), vol. 86, Springer-Verlag, Berlin, 1979, 168 p.

Genetica şi structura virusurilor de toate tipurile, văzute în strînsă legătură cu variabilitatea şi puterea lor de infectivitate, sînt subiecte ce preocupă astăzi multe laboratoare din lume. Interesul apare normal mai ales dacă luăm în considerare implicaţiile teoretice şi practice ale unor astfel de studii. Situarea virusurilor la graniţa dintre viu şi neviu le face extrem de atractive studiului, întrucît ele infectează toate tipurile de celule, iar din punct de vedere evolutiv poziţia lor în scara filogenetică nu este încă bine precizată.

Trei subiecte mari sînt cuprinse în volumul 86 al acestei serii. Primul se ocupă de aspecte privind potenţialul genetic al bunyavirusurilor, iar al doilea tratează despre controlul replicării virusului leucemiei murine de către gena Fo-1 a şoarecelui. S-a observat de aproape 30 de ani că, în urma pasajelor virusului influenţa în embrionii de găină, apare o scădere a infectivităţii, ceea ce a dus la concluzia că, alături de virusul activ, este sintetizat şi un virion defectiv, neinfecţios. Diferite aspecte privind şi proprietăţile particulelor virale defective (neinfecţioase), relaţia dintre biosinteza lor şi a virionilor infecţioşi, mecanismele prin care particulele defective inhibă replicarea celor infecţioase, sinteza de interferon vizavi de producţia de particule defective etc. constituie cel de-al treilea subiect considerat în cele două articole asupra virusurilor din genul Togavirusurilor şi, respectiv, Rhabdovirusurilor.

Prin materialul prezentat, cartea se adresează biochimiştilor din domeniul microbiologiei şi al virusologiei, precum şi celor care vor să-şi lărgească orizontul în aceste domenii de mare interes pentru biologia contemporană.

Ştefan Hulea

Current topics in microbiology and immunology (Probleme actuale în microbiologie și imunologie), vol. 87, Springer-Verlag, Berlin, 1979, 172 p.

Volumul 87 al seriei conține trei referate generale, care tratează aspecte privind exprimarea unor virusuri DNA și RNA în celulele eucariote.

Astfel, în primul articol autorii prezintă rezultatele lor asupra exprimării virusului simian și a celui poliomielitic în culturi de celule folosind tehnica microinjecției. Prin această tehnică se pot realiza injecții a 1—2 molecule de virus SV40, pe cînd în tehnicile convenționale sînt necesare 100 de particule de virus. De asemenea, se poate face testarea directă la nivel celular, cercetătorul cunoscînd care celulă este infectată și cu ce cantitate de material viral. Tehnica descrisă va permite, fără îndoială, aprofundarea cîmpului de investigație în domeniul exprimării diferitelor gene virale sau nevirale în celulele eucariote.

În al doilea referat se analizează probleme privind mecanismele de sinteză și de integrare în genomul celulei-gazdă a fragmentelor de DNA obținute prin transcripția genomului RNA viral cu ajutorul reverstranscriptazei. Se discută apoi transcripția RNA viral din DNA integrat în DNA al celulei infectate. Aplicarea tehnicilor DNA recombinat în acest domeniu va duce la elucidarea secvenței RNA viral și mai tîrziu la explicarea existenței însăși a virusurilor RNA.

În ultimul articol se face o detaliată trecere în revistă a organizării și a transcripției genomului virusului simian SV40.

Ștefan Hulea

Current topics in microbiology and immunology (Probleme actuale în microbiologie și imunologie), vol. 88, Springer-Verlag, Berlin, 1979, 142 p.

Problema fixării azotului de către plantele superioare, prin intermediul bacteriilor din genul *Rhizobium*, preocupă multe laboratoare din lume. Acest lucru este firesc avînd în vedere nevoia mereu crescîndă de hrană pentru populația globului, în continuă explozie demografică. Cunoașterea cît mai amănunțită a geneticii acestor microorganisme va permite realizarea la alte plante de cultură a unei simbioze de tipul celei întîlnite la leguminoase, avînd ca rezultat final creșterea conținutului de proteine al respectivelor plante. Diverse aspecte privind genetica bacteriilor fixatoare de azot din specia *Rhizobium lupini* sînt discutate în primul articol al cărții. Autorul acordă o atenție deosebită studiilor referitoare la capacitatea de conjugare, la formarea de stele și la pigmentarea prin carotenoide, proprietăți ce sînt foarte utile în studiile de genetică a acestor bacterii.

În al doilea referat general se trec în revistă cercetările asupra anticorpilor citofili. Introducerea unor noi tehnici pentru estimarea cantitativă a legării imunoglobulinei monomere de celule purtătoare de receptori pentru aceste macromolecule a permis o mai bună definire a activității citofile prin faptul că imunoglobulinele care se leagă de celule pot fi descrise în termenii unei afinități măsurabile față de receptori determinați de pe suprafața celulei. Acest mod de abordare a problemei anticorpilor citofili a impulsionat cercetările asupra caracterizării situsurilor active ale imunoglobulinelor citofile și a receptorilor de pe membrană și a asigurat baza pentru studiul consecințelor formării complexelor imune asupra legării de celule și declanșării activității efectoare a anticorpilor.

În ultimul articol se prezintă o sinteză a informației pe care o avem în prezent asupra structurii și funcției cromatinei și cromozomilor folosind tehnici imunologice. Cea mai mare parte se referă la organizarea proteinelor cromozomale, insistîndu-se cu deosebire asupra histonelor. Prin informația ce o conține, volumul 88 al seriei va fi de un real folos biochimiștilor, biologilor, imunochimiștilor, studenților de la facultățile de biologie și medicină, precum și acelora care se interesează de domeniile cu dezvoltare rapidă a biologiei moleculare.

Ștefan Hulea

Gastric Cancer (Cancerul gastric), sub red. CH. HERFARTH și P. SCHLEG, Springer-Verlag, Berlin, 1979, 369 p.

Deși în ultimii ani s-a remarcat o oarecare scădere a incidenței cancerului gastric și cu toate progresele înregistrate pe plan terapeutic, chirurgia rămînînd principala formă de tratament, procentul celor care supraviețuiesc mai mult de 5 ani rămîne în continuare sub 50%.

Prin urmare, problema cancerului gastric, cu toate aspectele sale, oferă un exemplu de cercetare oncologică diversificată, care include epidemiologia, patogenia, histomorfopatologia, chirurgia și terapia de întreținere. Pentru a oferi clinicianului și cercetătorului din laborator o imagine unitară asupra stadiului actual al problematicii din acest domeniu, editorii acestui volum s-au îngrijit ca informația adunată de la experți recunoscuți pe plan mondial să constituie o sinteză a cunoștințelor atît pe plan teoretic cît și practic, adică a posibilităților de tratament. Astfel, sînt prezentate aspecte etiologice și epidemiologice, precum și cele privind cancerul gastric experimental. Interesante ni s-au părut studiile referitoare la factorii de risc care au putut fi identificați în alimentație și în mediul înconjurător. De exemplu, s-a observat că modul de conservare a alimentelor (afumate sau preparate în oțet), compoziția apei potabile (concentrația nitraților și a microelementelor) sînt de mare importanță în patogeneza cancerului gastric. Un capitol în care rezultatele sînt departe de a fi mulțumitoare este acela al markerilor biologici. Deși nu s-au pus în evidență markeri specifici în cancerul gastric, s-au observat valori crescute ale β_2-microglobulinelor serice (la 75% din cazuri), iar testul de stimulare a limfocitelor în prezența fitohemaglutininei și reacția pe piele indusă de dinitrobenzen sînt mult diminuate.

Analiza datelor expuse în carte va oferi o bază solidă pentru succesul prevenirii și al depistării în faze timpurii a cancerului gastric. O clasificare unitară histomorfologică a tipurilor de cancer gastric este absolut necesară pentru realizarea unui tratament standardizat. Importantă ni se pare discuția în jurul tratamentului primar al cancerului gastric, ca și combinarea diferitelor feluri de terapie, de exemplu radio- și chemoterapie. Prin materialul prezentat, cartea de față va suscita interesul clinicienilor și al chirurgilor din domeniul cancerului gastro-intestinal, precum și al acelora care lucrează în cercetarea fundamentală de oncologie.

Ștefan Hulea

G. LÖFFLER, P. E. PETRIDES, L. WEISS, H. A. HARPER, *Physiologische Chemie* (Chimie fiziologică), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 940 p.

De curînd a apărut a doua ediție, complet revăzută și prelucrată, a chimiei fiziologice, tratat de biochimie medicală și patologică, care se adresează studenților în medicină și medicilor, precum și tuturor celor interesați în aceste domenii importante ale științelor biologico-medicale.

Tratatul este structurat pe două părți distincte. Partea A tratează componentele și metabolismul celulei în 21 de capitole, dintre care 6 se referă la componentele de bază ale celulei (apă și bioelemente, glucide, lipide, nucleotide și polinucleotide, acizi nucleici, aminoacizi și poliaminoacizi, proteine și organite celulare), iar 15 au în vedere metabolismul, schimbul celular de energie și materie (biocataliza — enzimele, mecanismul și reglarea biosintezei acizilor nucleici și a proteinelor, defectele proteice determinate genetic, bioenergetica și oxidarea biologică, metabolismele intermediare ale glucidelor, lipidelor, aminoacizilor, purinelor și pirimidinelor, porfirinelor și pigmenților biliari, apa și electroliții, microelementele și vitaminele, alimentația). Partea B abordează structura și metabolismul țesuturilor, cuprinzînd 10 capitole (glandele endocrine și hormonii, tractul gastrointestinal, ficatul, sîngele, țesutul muscular, țesutul conjunctiv și de susținere, țesutul nervos, sistemul imun, rinichiul și urina, țesutul tumoral).

Față de prima ediție (apărută în 1975), cea de-a doua este îmbunătățită nu numai prin aducerea la zi a datelor, acumulate în cadrul diferitelor capitole tratate anterior, dar și prin restructurarea unora sau chiar introducerea de noi capitole. Autorii tratatului reușesc în felul acesta să țină pasul cu noile descoperiri realizate în ultimii ani în domenii ca ingineria genetică, reglarea genică în organismele superioare, biologia moleculară a tumorilor, caracterizarea unor peptide hipotalamice ș.a.

Diferitele capitole ale tratatului sînt foarte bogat ilustrate, prin 672 de figuri, respectiv fotografii, scheme și grafice, foarte sugestive și bine concepute, majoritatea bi- sau multicolore. Tratatul conține 199 de tabele. Fiecare capitol este însoțit de bibliografie, pe care o considerăm reprezentativă și judicios selectată.

Sabin-Sorin Vasu

Ö. GAAL, G. A. MEDGYESI, L. VERECZKEY, *Electrophoresis in the separation of biological macromolecules* (Electroforeza în separarea moleculelor biologice), Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1980, 422 p.

Există în prezent o mare diversitate de metode electroforetice adaptate de cercetători celor mai diferite scopuri.

Cartea de față oferă o descriere a principiilor celor mai importante tehnici de electroforeză în general, cu exemplificări referitoare la studiul proteinelor, al acizilor nucleici și al glucozaminoglicanilor. Exemplele nu constau în descrierea amănunțită a unor tehnici de lucru, ci în discutarea avantajelor și a dezavantajelor acestora.

Autorii dau și detalii de aparatură în unele cazuri, ca, de exemplu, electroforeza în gel de poliacrilamidă, electrofocusarea cu gradient de densitate sau microelectroforeza pe acetat de celuloză. Date metodologice concrete sînt prezente și în capitolul cuprinzînd electroforeza proteinelor; ele se referă la valoarea proteinelor, detectarea lor prin evidențierea activității enzimatice, electroimunodifuzie, imunoelectroforeza încrucișată. Sînt date de asemenea unele detalii referitoare la separarea electroforetică a anumitor grupe de proteine (ribozomale, nucleare, de membrană, hemoglobine, proteine și lipoproteine plasmatice, proteine din lichidul cefalorahidian, lapte și urină), ca și a acizilor nucleici.

Bibliografia bogată din finalul cărții îl ajută pe cititor să completeze cu date concrete ceea ce în lucrare se află sub formă de comentariu, selectînd în acest mod metoda cea mai potrivită scopului cercetării sale.

Elena Ganea

Advances in anatomy, embryology and cell biology, vol. 57, *Thalamocortical organization of the auditory system in the cat studied by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase*, de KAHEE NIIMI și HIROAKI MATSUOKA, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1979, 56 p., 30 fig.

Lucrarea se ocupă de descrierea citoarhitecturii proiecțiilor talamice spre cortexul auditiv, studiată cu metoda transportului axonal retrograd al peroxidazei. Sînt descrise amănunțit locurile de origine ale fibrelor talamice care se îndreaptă spre zonele auditive primară și secundară, părțile dorsală și ventrală ale zonei ectosilviene, zona insulotemporală, părțile anterodorsală și posteroventrală ale zonei senzoriale somatice.

Autorii au utilizat un bogat material experimental (61 de emisfere recoltate de la 45 de pisici normale adulte). Prezentarea datelor este foarte bine sistematizată, iar materialul ilustrativ, format în cea mai mare parte din reprezentări schematice, permite înțelegerea clară a rezultatelor.

Lucrarea reprezintă concretizarea unei cercetări intense și minuțioase, constituind un real progres în cunoașterea cortexului auditiv. Ea este utilă atît cercetării și practicii medicale, cît și celor care se ocupă de fiziologia normală și patologică a sistemului nervos.

Anca Petrescu-Raianu

Neurofiziologhiceskie osnovi pameati. Gagrskie besedi, VII (Neurophysiological bases of memory. Gagrskie besedy, VII; Bazele neurofiziologice ale memoriei. Dezbaterile de la Gagra, VII), Mețniereba, Tbilisi, 1979, 596 p.

Începînd din anul 1948, la interval de 3—4 ani, au loc în orașul Gagra (U.R.S.S.) simpozioane dedicate diferitelor probleme de neurofiziologie, cu participarea atît a neurofiziologilor, cît și a specialiștilor în neuromorfologie, neurofarmacologie și neurochimie.

Volumul recent este dedicat mecanismelor memoriei umane și animale și cuprinde 36 de comunicări prezentate la cel de-al VII-lea simpozion de neurofiziologie ce a avut loc în anul 1978. La acest simpozion, pe lîngă specialiști sovietici, ca I. A. Altman, A. N. Bakuradze, N. P. Behtereva, V. A. Cerkez, N. N. Dzidzișvili, U. G. Gasanov, P.I. Iliuceonov, A.P. Kometiani, B. I. Kotlear, R. I. Kroglikov, T. A. Natișvili, V. M. Okudjana, T. N. Oniani, V. S. Rusinov, F. N. Serkov, A. I. Șipovalov, G. A. Vartanian și alții, au participat și savanții D. Adams (S.U.A.), I. Bureș (Cehoslovacia), G. Horn (Anglia), B. Jerniţki (Polonia), F. Klinberg (R.D.G.),

T. Ott (R.D.G.), T. Radil-Weis (Cehoslovacia) și K. Zelinski (Polonia). Comunicările au fost însoțite de material ilustrativ (tabele, scheme, desene și fotografii), de liste bibliografice și, ceea ce este deosebit de important, de textul dezbaterilor ce au avut loc. Comunicările participanților sovietici au fost prezentate în limba rusă, iar ale celor străini în limba engleză. Ele s-au referit la : însușirile plastice ale legăturilor hipocampice, sinaptice ; organizarea neuronală a engramei memoriei ; ipoteza glială a formării legăturilor temporare ; analiza matematică a activității electrice a creierului uman ; mecanismul memoriei în cursul percepției vizuale ; particularitățile păstrării urmelor reacțiilor condiționate la reprezentanți ai diferitelor vertebrate ; mecanismele celulare ale formării și reproducerii proceselor memoriale ; cercetarea neuropsihologică a memoriei la animale ; participarea adenozinmonofosfatului ciclic la activitatea funcțională a celulei nervoase ; dezvoltarea memoriei vizuale la pisici etc.

Volumul prezintă interes nu numai pentru neurofiziologi, ci și pentru toți cei care lucrează în domeniile conexe și care se preocupă de problemele memoriei.

Eugen Macovschi

M. SCHIECHE, *Der Stoffwechsel des gesunden Menschen* (Metabolismul omului sănătos), VEB-Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1979, 136 p., 99 fig., 4 tabele.

Pornind de la cunoștințele actuale în domeniul biochimiei, volumul face o prezentare a principalelor aspecte ale metabolismului uman, orientîndu-se cu prioritate asupra acelor aspecte care țin de practica întreținerii unui metabolism normal. Pentru a realiza o asemenea prezentare cu finalități utilizate, cartea începe cu constituenții normali ai corpului uman, urmînd în această privință împărțirea clasică (zaharuri, lipide, protide, acizi nucleici, vitamine etc.).

Sînt apoi prezentate unele probleme generale de biofizică și biochimie, cum ar fi echilibrele de membrană, difuzia, osmoza, coloizii, oxidoreducerea, cataliza, precum și unele chestiuni de fiziologie, ca structura și funcțiile celulei, hormonii și reglarea umorală, sistemul nervos vegetativ și altele.

Se trece apoi la prezentarea propriu-zisă a diferitelor metabolisme și, ceea ce este important, se fac în acest sens corelații utile și sugestive.

Se acordă o deosebită atenție problemelor privind organismul ca sistem unitar, insistîndu-se în mod deosebit asupra integrării organismului uman și asupra aspectelor de organizare a fluxului informațional.

Destinată publicului larg și deci mai puțin specializat, lucrarea izbutește să prezinte concis, limpede și sugestiv o serie de cunoștințe utile și constituie o lectură nu numai atractivă, dar totodată și necesară.

Cartea dispune de un scurt index de termeni și de o bibliografie selectivă, foarte binevenită pentru cei interesați în această privință.

Mihai Zamfir

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of chemicals to Humans. Volume 20 : Some Halogenated Hydrocarbons (Monografii IARC asupra evaluării riscului carcinogenic la om. Vol. 20 : Unii compuși halogenați ai hidrocarburilor), International Agency for Research on Cancer, Lyon, October 1979, 609 p.

Volumul de față reprezintă punctul de vedere al experților din Grupul de lucru IARC, întruniți la Lyon între 6 și 13 iunie 1978. Ca și în volumele anterioare, se menționează de la început obiectivul IARC, criteriile de selectare a substanțelor ce vor figura în monografii, procedurile de lucru ale experților, principiile generale de evaluare a riscului carcinogenic pentru unele substanțe. Rubricile ce formează monografia unei substanțe sînt : date fizice și chimice ; producție, utilizări, documentare, analiză ; date biologice relevante pentru evaluarea riscului carcinogenic la om ; bibliografie.

Conform acestei scheme, se abordează mai întîi în general pesticidele și bactericidele ce conțin resturi de hidrocarburi aromatice halogenate și solvenții cu aceeași structură de bază.

Din prima categorie menționăm pe cele mai cunoscute : heptaclorul și heptaclorepoxidul, hexaclorbenzenul și hexaclorciclohexanul, iar dintre solvenți — tetraclorura de carbon, cloroformul, tricloretilena.

Volumul cuprinde și un index al substanțelor considerate în volumele 1—20.

Vl. Gheordunescu

IARC Monographs on the Evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Chemicals and Industrial Processes Associated with Cancer in Humans (Monografii IARC asupra evaluării riscului carcinogenic la om. Substanțe și procese industriale asociate cu cancerul la om), Volumes 1 to 20, Supplement 1, International Agency for Research on Cancer, Lyon, September 1979, 71 p.

Grupul ad-hoc de lucru IARC, întrunit în octombrie 1977, a revizuit criteriile de apreciere a riscului carcinogenic, acordîndu-se o mai mare pondere datelor furnizate de experimentele pe animale de laborator. Noile criterii au intrat în vigoare începînd cu volumul 17 (1977).

Volumul de față, care este editat ca supliment, în urma întrunirii de la Lyon (15—17 ianuarie 1979) a Grupului de lucru, reindexează 54 de substanțe (din volumele 1—20) și procese chimice diverse. Dintre aceste substanțe, 18 sînt carcinogene pentru om, 18 sînt probabil carcinogene (existînd și aici două subgrupe), iar pentru celelalte 18 s-a considerat că nu sînt date suficiente ca să se poată evalua riscul carcinogenic. Menținerea fiecăreia dintre substanțele considerate este însoțită de trimiterea la monografiile IARC anterioare sau la lucrările apărute între timp.

Sînt incluse un index cumulativ de substanțe chimice pentru volumele 1—20, precum și o clasificare a acestor agenți cu potențialul carcinogenic pe organe-țintă.

Vl. Gheordunescu

Directory of on-going Research in Cancer Epidemiology (Indexul cercetării actuale în epidemiologia cancerului), 1979, IARC Scientific Publications No. 28, C.S. MUIR, G. WAGNER (sub redacția), International Agency for Research on Cancer — Deutsches Krebsforschungszentrum, Lyon, 1979, 672 p.

Acest volum indexează, ca scurte rezumate, proiectele de cercetare în domeniul epidemiologiei cancerului, finalizate în 1979 sau în curs de desfășurare, în ordinea alfabetică a țărilor în care se întreprind asemenea cercetări (1092 de proiecte în 67 de țări).

Volumul cuprinde, de asemenea, o listă a cercetătorilor implicați în aceste proiecte, o listă de termeni (de fapt un index general al condițiilor, substanțelor, analizelor etc. ce sînt în relație cu diferite tipuri de cancer), o listă a substanțelor chimice menționate de autorii proiectelor de cercetare — toate în ordine alfabetică și cuprinzînd, ca subdiviziuni, tipurile de cancer studiate. Există un index care are drept criteriu și localizarea neoplasmului în organism.

Volumul mai conține o listă a posibilităților de abordare a studiilor de epidemiologie a cancerului, o listă a țărilor ce finanțează proiectele de cercetare menționate și o listă a cercetătorilor, cu adresele lor.

Prin sintezele pe care le cuprinde, volumul este un index util tuturor cercetătorilor în domeniul cancerului.

Vl. Gheordunescu

Advances in Protoplast Research. Proceedings of the 5th International Protoplast Symposium (Realizări în cercetarea protoplaștilor. Lucrările celui de-al 5-lea Simpozion internațional al protoplaștilor), sub redacția L. FERENCZY, G. FARKAS, editor asociat GABRIELLA LÁZÁR, Akadémiai Kiadó, Budapesta, 1980, 505 p.

Volumul reunește în cuprinsul său un număr impresionant de articole prezentate cu prilejul celui de-al 5-lea Simpozion internațional al protoplaștilor, care a avut loc la Szeged (R. P. Ungară) în august 1979. Simpozionul s-a înscris ca o manifestare științifică prestigioasă, întrunind peste 300 de participanți din 33 de țări, printre aceștia înscriindu-se nume consacrate în domeniu.

În cadrul simpozionului au fost prezentate lucrări asupra celor mai importante și actuale probleme legate de izolarea, creșterea și folosirea protoplaștilor în experimente diverse de inginerie genetică.

În partea de început se prezintă un referat de sinteză, elaborat de către Cocking, în care sînt trecute în revistă rezultatele obținute pînă în prezent, curentele noi de cercetare apărute, precum și perspectivele deosebite pe care protoplaștii le oferă cercetării biologice moderne.

Celelalte articole sînt grupate, în funcție de tematica abordată, în două categorii. Într-o primă parte sînt lucrările privind protoplaștii microorganismelor, incluzînd bacterii, drojdii, fungi. În a doua parte sînt incluse articole în care sînt abordate aspecte privind protoplaștii plantelor superioare. În ambele categorii de lucrări sînt tratate probleme foarte diverse, incluzînd aspecte de structură și metabolism, de metodologie privind posibilitățile de izolare și de fuzionare inter- și intraspecifice și genetice și obținerea pe această cale a hibrizilor somatici la plante superioare și inferioare, inducerea embriogenezei somatice etc.

O categorie importantă de lucrări au abordat problema integrării DNA exogen în plante, folosirea plasmidelor bacteriene în acest scop, utilizarea protoplaștilor plantelor superioare pentru experimente de transformare prin *Agrobacterium* și plasmide izolate, transferul de organite subcelulare în protoplaști etc.

Cartea se încheie cu un index al autorilor, al organismelor și al subiectelor, înlesnind în acest fel realizarea unei informări rapide a cititorului.

Volumul impresionant de date cuprins în lucrări și numărul mare de indicații bibliografice care însoțesc fiecare articol în parte fac ca această carte să reprezinte un material informațional la zi, de o înaltă ținută științifică, deosebit de util pentru citologi, geneticieni, fiziologi și biochimiști.

Aurelia Brezeanu

J. GERGELY, *Immunbiologia* (Imunobiologie), Medicina, Budapesta, 1979, 312 p., 127 fig., 36 tabele.

Imunologia continuă să fie unul din domeniile în care rata de îmbogățire a cunoștințelor este foarte ridicată. A scrie o monografie ori un manual care să acopere toate domeniile imunologiei este o sarcină dificilă. Selectarea cunoștințelor, uneori contradictorii, relevarea anumitor verigi din lanțul de informații sînt hotărîtoare pentru elaborarea unui manual de calitate. Cartea semnată de J. Gergely întrunește calitățile unui bun manual, fiind adresată biologilor, medicilor, studenților care doresc să se inițieze în imunologie.

Cartea este împărțită în trei capitole : imunochimie, imunobiologie și imunopatologie.

Capitolul de imunochimie (112 p.) prezintă cunoștințe referitoare la antigen (terminologie, clasificare, proprietăți chimice, fizico-chimice), reacția antigen — anticorp (tipuri de reacții serologice, specificitatea și afinitatea anticorpilor), imunoglobulinele (clasificare, structură primară-spațială, tipuri de lanțuri și proprietăți, genetica imunoglobulinelor, sistemul complement). De remarcat că materialul este prezentat într-un mod propriu biochimiei și biofizicii macromoleculelor, fiind inserate de altfel cunoștințele obținute prin tehnici proprii acestor domenii.

Capitolul de imunobiologie (124 p.) cuprinde subcapitole referitoare la celulele care participă la procesele imune, mecanismele de elaborare a răspunsului imun, tipurile de imunitate, toleranța, mecanismele de toleranță, reglarea genetică a proceselor imune, filogeneza și ontogeneza răspunsului imun.

Capitolul de imunopatologie (54 p.) prezintă tipurile de reacții (anafilactic, citotoxic), boli imune, autoimunitate, imunologia transplantelor, imunologia tumorilor.

Autorul s-a străduit, printre altele, de a releva conexiunile dintre diferitele probleme ale imunochimiei și imunobiologiei, ceea ce ușurează înțelegerea materialului prezentat și permite conturarea ariilor încă insuficient înțelese, posibile obiective de cercetare. Cartea se încheie cu un cuprinzător glosar și index tematic. De remarcat prezentarea grafică a cărții ; numeroasele figuri și scheme ușurează înțelegerea materialului.

Gabriela Angel

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale la nivel științific superior din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca : Viața științifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștință cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente ucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Autorii au dreptul la un număr de 30 de extrase gratuit.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacție : 78200 — București 2, P.O.B. 2—2.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

D. A. ABRAHAM, *Mecanismul de acțiune al hormonilor steroizi*, 1975, 184 p., 13 lei.

S. OERIU, I. OERIU, *Grupările tiolice și rolul lor în biologie*, 1977, 332 p., 31 lei.

ELENA GABRIELESCU, *Neuroproteazele*, 1978, 157 p., 22 lei.

C. TAȘCĂ, *Histopatologia tiroidei*, 1978, 159 p., 20 lei.

IOANA MILCU, LYDIA NANU, *Glanda pineală ca organ metabolic*, 1979, 190 p., 9,50 lei.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 23, NR. 2, P. 121—240, BUCUREȘTI, IULIE—DECEMBRIE 1980

1981 JAN 16

I. P. „Informația" c. 2575

43 816

Lei 20